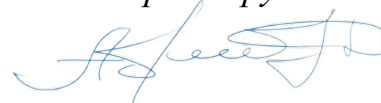


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»

*На правах рукописи*



Абрамова Наталья Дмитриевна

**Особенности PRR опосредованных механизмов  
мукозального иммунитета при вирусной инфекции,  
вызванной SARS-CoV-2**

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор РАН,

член-корреспондент РАН

Свитич Оксана Анатольевна

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Новая коронавирусная инфекция: происхождение и распространенность, морфология, мутагенез, клинические проявления .....	13
1.2. Иммунитет слизистых оболочек .....	23
1.3. Механизмы адаптивного иммунитета .....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	47
2.1. Материалы .....	47
2.1.1. Характеристика клинических групп .....	47
2.2. Методы .....	53
2.2.1. Выделение нуклеиновых кислот .....	53
2.2.2. Реакция обратной транскрипции .....	54
2.2.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени .....	55
2.2.4. Иммуноферментный анализ .....	56
2.2.5. Мультиплексный иммуноферментный анализ .....	57
2.2.6. Статистическая обработка результатов .....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	60
3.1. Анализ экспрессионного профиля рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей в группе условно здоровых лиц .....	60
3.2. Экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц со среднетяжелым течением COVID-19 ....	64
3.3. Изменения экспрессионного профиля молекул врожденного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением COVID-19 в зависимости от штамма .....	81
3.4. Экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц, перенесших заболевание COVID-19 .....	85
3.5. Экспрессия провоспалительных цитокинов (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с отягощённым анамнезом .....	91

3.6. Оценка белкового профиля цитокинов и sIgA при исследуемой инфекции на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей .....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	100
ВЫВОДЫ .....	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Инфекционные болезни остаются значимой причиной заболеваемости и смертности людей, приводя к эпидемиям. Острые респираторные вирусные заболевания ежегодно уносят множество жизней и вызывают миллионы госпитализаций как в развитых странах, так и в развивающихся странах. Поскольку инфекции с эпидемическим и пандемическим потенциалом, преследуют людей с самого начала человеческой истории, появление новых вирусных заболеваний, поражающих дыхательные пути, продолжает угрожать безопасности общественного здравоохранения. Эпидемиологические исследования указывают на то, что респираторные вирусные заболевания занимают одно из ведущих мест среди причин заболеваемости и смертности, что в свою очередь приводит к значительной нагрузке на системы здравоохранения [1].

Заболевание COVID-19, вызванное вирусом SARS-CoV-2, стало причиной одной из самых серьезных пандемий за последнее столетие. По данным ВОЗ в Российской Федерации с 3 января 2020 г. до 10 мая 2023 г. было зарегистрировано 22 884 493 подтвержденных случая заболевания COVID-19 с 398 578 летальными исходами [1]. На сегодняшний день заболевание COVID-19 признано «сезонным заболеванием». Известно, что основная форма передачи от человека к человеку происходит воздушно-капельным путем [2]. Следовательно, кашель и чихание переносят вирус SARS-CoV-2 в воздух, подвергая неинфицированных людей риску заражения [3, 4]. Таким образом, вирус SARS-CoV-2 проникает в организм в основном через слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Таким образом иммунитет слизистых оболочек является одним из механизмов защиты, который может предотвратить инфекцию на раннем этапе [4].

Исследования иммунитета слизистых оболочек в контексте COVID-19 стали важнейшей областью исследований с самого начала пандемии. Научный интерес

к этой теме исходит из понимания того, что SARS-CoV-2 в первую очередь проникает в организм через дыхательные пути, делая иммунную систему слизистых оболочек первой линией защиты от инфекции. Ранние исследования подчеркнули важность врожденного иммунного ответа в дыхательных путях. Исследования показали, что эпителиальные клетки, выстилающие дыхательные пути, экспрессируют рецепторы, в частности рецептор ангиотензин превращающего фермента 2 типа (АПФ2), которые вирус SARS-CoV-2 использует для проникновения в клетки [5, 6]. Врожденный иммунитет реагирует на вирусную инвазию посредством высвобождения факторов противовирусной защиты и других эффекторных молекул, а также привлечением иммунных клеток, таких как нейтрофилы и макрофаги [7]. Некоторые исследования указывают на то, что системные уровни антител могут снижаться со временем, в то время как антитела слизистой оболочки могут сохраняться дольше, обеспечивая постоянную защиту от повторного заражения [8]. Однако, большинство исследований сосредоточены на антителах и клеточном иммунитете в периферической крови, иммунные реакции слизистых оболочек дыхательных путей играют ключевую роль в раннем ограничении репликации вируса и элиминации SARS-CoV-2. Ко всему прочему, появление новых вариантов вируса SARS-CoV-2 создает проблемы в понимании того, как эти варианты влияют на иммунные реакции слизистых оболочек. Таким образом, продолжительность и эффективность защиты врожденных и адаптивных реакций иммунной системы слизистой оболочки остается предметом исследования.

### **Степень разработанности темы исследования**

Исследования мукозального иммунитета при COVID-19 все еще находятся на ранних стадиях. Большинство исследований сосредоточены исключительно на сывороточных антителах и системном клеточно-опосредованном иммунитете, игнорируя важную роль врожденного компонента мукозального иммунитета.

Знания о профиле экспрессии генов участвующих в иммунном ответе при инфекционных заболеваниях, включая COVID-19, обширны. В работах, Adrian Ozinsky (2000 г.), Himanshu Kumar (2009 г.), Xiaowei Li (2020 г.), Maria Clara Saad Menezes (2021 г.) отражена роль рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета, в том числе и в контексте заболевания COVID-19, однако все эти исследования акцентированы на системный иммунный ответ. Экспрессионный профиль рецепторных и эффекторных молекул врожденного мукозального иммунитета изучен недостаточно. Однако комплексное исследование регуляции механизмов иммунитета на уровне экспрессии генов и белковых молекул на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов со среднетяжелой формой заболевания и у пациентов, перенесших заболевание COVID-19, до сих пор не проводилось. Данные, полученные в работе, важны, не только по причине уточнения иммунопатогенеза заболевания, но и ввиду того, что могут являться потенциальными мишенями при диагностике и терапии как самого заболевания COVID-19, так и для купирования длительных симптомов после перенесенной инфекции.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** настоящей работы является изучение иммунологических факторов врожденного и адаптивного мукозального иммунитета у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. Определить экспрессионный профиль рецепторов и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19.
2. Оценить экспрессионный профиль факторов врожденного иммунитета на локальном уровне у лиц, перенесших заболевание COVID-19.

3. Исследовать белковый профиль молекул врожденного и адаптивного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением заболевания, а также у лиц, перенесших заболевание COVID-19.

4. Провести корреляционный анализ факторов врожденного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением заболевания, а также у лиц, перенесших заболевание COVID-19.

### **Научная новизна**

Впервые был проведен транскриптом факторов врожденного иммунитета у пациентов как со среднетяжелым течением заболевания COVID-19, так и у перенесших исследуемую патологию. Был оценен экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета включая рецепторный аппарат (в частности, Toll-подобных рецепторов, таких как TLR3 и TLR7) и эффекторные молекулы (включая IL1 $\beta$ , IL18, IL28, TNF $\alpha$  и HBD2) а также ключевых молекул адаптивного иммунного ответа на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Исследование охватывает как пациентов в острой фазе COVID-19 со средней тяжестью заболевания, так и тех, кто уже перенёс инфекцию. Анализировался экспрессионный профиль молекул врожденного мукозального иммунитета в зависимости от вирусного штамма COVID-19. Также были изучены изменения экспрессионного профиля у лиц с отягощённым анамнезом после перенесённого заболевания.

Обнаруженные изменения экспрессии молекул врожденного иммунитета наблюдаются как на локальном, так и на системном уровнях. Исследование роли иммунитета слизистых оболочек обеспечивает новые сведения о механизмах защиты от повторного заражения.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные могут служить основой в области разработки и применения новых диагностических подходов и лекарственных средств. Результаты данной работы могут использоваться для разработки новых подходов, при которых состояние мукозального иммунитета будет учитываться в выборе стратегии лечения, что позволит снизить частоту осложнений и уменьшить количество летальных исходов для различных групп пациентов. Обнаруженные данные изменения экспрессионного профиля молекул врожденного иммунитета могут использоваться в разработке новых биомаркеров, что позволит более эффективно проводить скрининг и мониторинг уязвимых групп населения. В результате исследования разработан алгоритм изменения некоторых эффекторных и рецепторных молекул врожденного иммунитета. Комплексный подход, включающий изучение экспрессии генов иммунных факторов и цитокиновой продукции на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей, позволит применять подходы персонализированной медицины с целью коррекции терапии.

## **Методология и методы исследования**

Методологической основой данного исследования являлись работы в области изучения молекулярных основ экспрессии генов, вовлеченных в патогенез заболевания COVID-19. Данная работа направлена на изучение молекулярных механизмов молекул врожденного мукозального иммунитета в ответ на заболевание COVID-19.

Методы исследования включали сбор биологического материала (соскобы ротоглотки, носоглотки, отделяемое ротовой полости, сыворотка крови) от пациентов со среднетяжелой формой течения заболевания COVID-19, а также от пациентов, перенесших данное заболевание и необходимых медицинских данных.

В работе использовались молекулярно-генетические и иммунодиагностические методы. Результаты, полученные в ходе исследования, регистрировались и подвергались статистической обработке.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал личное участие в планировании экспериментальной части исследования, в проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных данных, в том числе и в статистической обработке результатов. Написание обзорной части работы, а также глав собственных исследований по полученным результатам выполнено автором самостоятельно. Подготовка публикаций по проведенной работе, апробация результатов исследования, написание и оформление данной рукописи выполнены автором самостоятельно.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Обнаружен дисбаланс в экспрессионном профиле молекул врожденного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 на уровне слизистых оболочек носоглотки: на фоне снижения экспрессии генов *TLR3* и *TLR7* в первые дни заболевания COVID-19, наблюдается увеличение экспрессии эффекторных молекул врожденного иммунитета (*IL1 $\beta$* , *IL28*, *TNF $\alpha$* ). В ротоглотке экспрессия факторов врожденного иммунитета снижается.

2. Сохраняется дисбаланс в уровне экспрессии факторов молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых верхних дыхательных путей у пациентов, перенесших заболевание COVID-19. Детектируется снижение уровня экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *IL1 $\beta$*  и *IL28* в ротоглотке через 4 месяца после перенесенного заболевания COVID-19, на фоне общего увеличения этих генов в носоглотке в тот же период.

3. Выявлено увеличение продукции цитокинов, отвечающих за активацию клеточного иммунитета (IL2 и др.), также как и продукция секреторных sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19.

4. Определена взаимосвязь между рецепторным аппаратом и факторами врожденного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 и у лиц, перенесших данную патологию.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Направление диссертационного исследования соответствует п. 2 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии», п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» паспорта специальности 3.2.7. Иммунология (медицинские науки).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов определяется тщательным подходом к выбору лабораторных методов, а также применением статистических подходов обработки полученных результатов. Сформулированные выводы отражают результаты проделанной работы и согласуются с поставленными целью и задачами исследования.

Материалы работы доложены на конференциях с международным участием: Первый международный конгресс Медицинская реабилитация: научные исследования (2022 год, г. Санкт-Петербург), III Национальный конгресс с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды «Сысинские чтения» (2022 год, г. Москва), международный

конгресс 20th European Respiratory Society Lung Science Conference (г.Эшторил, Португалия, 2022), международная научно-практическая конференция «Life after COVID-19» (2022 год, Алмата, Казахстан), и была отмечена первым местом в номинации «конкурс молодых ученых». Материалы работы были доложены на Девятой научно-практической школе-конференции Аллергология, клиническая иммунология и инфектология для практикующих врачей (2023 год, г.Сочи).

Апробация материалов диссертации проведена на заседании Отдела иммунологии и аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» 19 сентября 2024 года (протокол №4).

### **Публикации по теме диссертации**

Результаты работы представлены в 15 печатных работах, в том числе 4 научные работы индексируемых в международных базах данных Web of Science, Scopus, PubMed, Chemical Abstracts, Springer («Sci Rep», «J Clin Cell Immunol», «Drugs Context»). 1 статья, в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России («Медицинский вестник МВД»); 1 монография (глава в книге «Мукозальный иммунитет у пациентов с COVID- 19: Лечение и Реабилитация», Издательство «Группа МДВ») и 6 иных публикаций в изданиях «Российский иммунологический журнал», «Терапия», «Терапевтический архив», «Пульмонология», «Инфекция и иммунитет»; 3 тезисов в изданиях «European Respiratory Journal, Supplement», «European Respiratory Journal», «European Respiratory Journal Open Research».

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 126 страницах текста, содержит 5 таблиц, 35 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, применение результатов и научных выводов, список цитируемой литературы. Библиографический указатель включает 170 наименований, из них 14 отечественных и 156 иностранных источника.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Новая коронавирусная инфекция: происхождение и распространенность, морфология, мутагенез, клинические проявления

Инфекционные болезни продолжают оставаться одной из главных причин заболеваемости и смертности среди людей, вызывая эпидемии по всему миру [9]. Острые респираторные вирусные заболевания ежегодно забирают более 6 миллионов жизней и приводят к множеству госпитализаций как в развитых, так и в развивающихся странах. Развитие и появление новых респираторных инфекций с эпидемическим и пандемическим потенциалом, поражающих дыхательные пути, продолжает угрожать безопасности мирового общественного здравоохранения. Всесторонние эпидемиологические оценки респираторных заболеваний показывают, что инфекции дыхательных путей являются одной из самых распространенных причин заболеваемости и смертности во всем мире, что создает огромную нагрузку на службы здравоохранения (Рисунок 1) [10]. Пандемия новой коронавирусной болезни, вызванной вирусом SARS-CoV-2, была классифицирована ВОЗ как зоонозное заболевание.

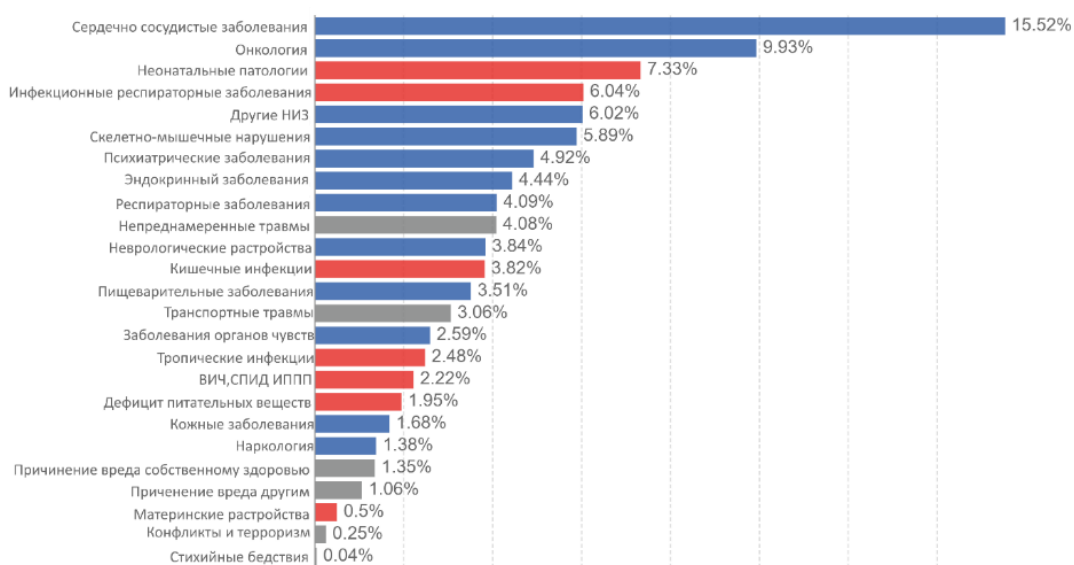


Рисунок 1 – Распространенные причины заболеваемости и смертности [11]

## *Происхождение и распространенность SARS-CoV-2*

В декабре 2019 года новый коронавирус (SARS-CoV-2) был обнаружен у 3 пациентов с пневмонией, связанных с кластером острых респираторных заболеваний в городе Ухане, Китай. К концу марта 2020 года новый коронавирус распространился по всему миру и вызвал пандемию [9]. 30 января 2020 г. ВОЗ объявила распространенность вируса SARS-CoV-2 шестой (за последние 20 лет) чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение, после H1N1 (2009 г.), полиомиелита (2014 г.), лихорадки Эболы в Западной Африке (2014 г.), лихорадки Зика (2016 г.) и лихорадки Эболы в Демократической Республике Конго (2019 г.). 12 марта 2020 года ВОЗ объявила заболевание COVID-19, вызванное вирусом SARS-CoV-2, пандемией [12].

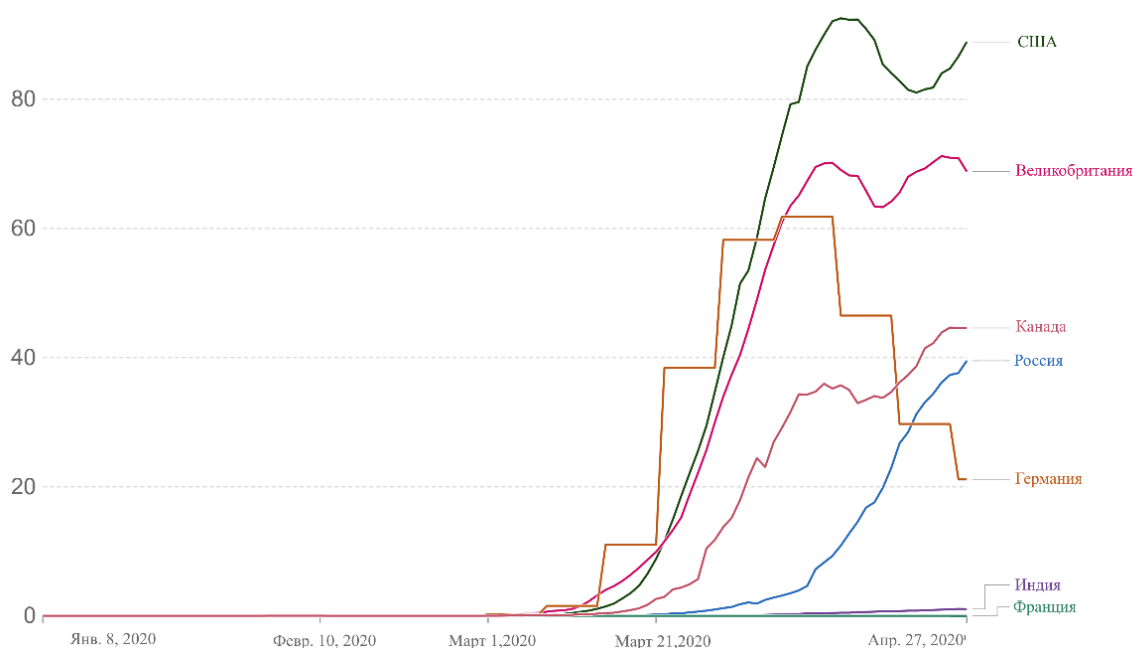


Рисунок 2 – Число зарегистрированных случаев заражения инфекцией SARS-CoV-2 (в млн.чел.) [1]

На сегодняшний день, вирус SARS-CoV-2 является, седьмым обнаруженным коронавирусом, инфицирующим людей [13]. В 2003 году в Китае и Гонконге была зарегистрирована вспышка тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV). В 2012 году в регионах Ближнего Востока и Республики Корея произошла вторая вспышка, известная как ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV).

Однако, SARS-CoV-2 продемонстрировал более широкое и быстрое распространение, чем другие коронавирусы (Рисунок 2). Действительно, его базовое репродуктивное число ( $R_0$ ) почти на порядок выше по сравнению с остальными представителями той же группы ( $R_0 \text{ SARS-CoV-2} > R_0 \text{ SARS-CoV} > R_0 \text{ MERS-CoV}$ ). Все три коронавируса считаются зоонозными по происхождению и вызывают заболевания различной степени тяжести у людей [14]. Из-за большого генетического разнообразия и частой рекомбинации их геномов, а также взаимодействия человека и животных, новые коронавирусы, вероятно, будут периодически появляться у людей из-за частых межвидовых инфекций [13]. Один из возможных путей передачи SARS-CoV-2 происходит от летучих мышей, но, возможно, инфекция передавалась людям через других промежуточных животных, которые потенциально могли быть получены с местного рынка морепродуктов в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай [15]. Исследование, проведенное Xiao et al. [16] показало, что для передачи SARS-CoV-2 человеку необходим промежуточный носитель, поскольку подсемейство *Coronavirinae* летучих мышей, почти неспособны инфицировать человека. В данном исследовании также сообщается, что китайские и малайские дикие панголины были подвержены инфицированию подсемейство *Coronavirinae*, подобные SARS-CoV-2. После тщательного анализа было обнаружено, что один рецептор-связывающий домен (RBD) в шиповом белке Pangolin-CoV имеет незначительное отличие только в одной аминокислоте от домена SARS-CoV-2. Эти данные также показали, что SARS CoV-2 потенциально мог возникнуть в результате рекомбинации вируса между Pangolin-CoV и Bat-nCoV перед передачей человеку [16].

Существуют основные и дополнительные пути передачи вируса, которые наблюдались на протяжении всей пандемии [17]. В настоящее время признано, что основная форма передачи от человека к человеку происходит воздушно-капельным путем. Следовательно, кашель и чихание переносят частицы SARS-CoV-2 в воздух, подвергая неинфицированных людей риску заражения [3, 4].

Пандемия вызванная SARS-CoV-2 распространилась более чем на 200 стран, тем самым приобретая статус «эмереджная инфекция» [12, 18].

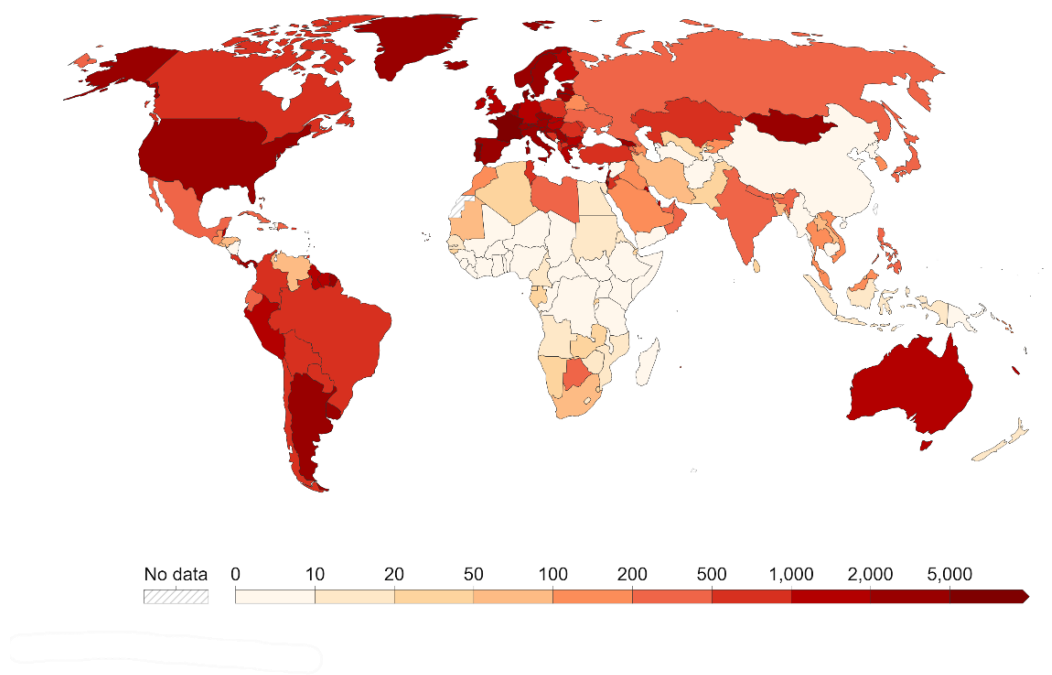


Рисунок 3 – Число новых дневных зарегистрированных случаев заражения инфекцией SARS-CoV-2 на 1 млн.чел. по состоянию на 25 января 2022 года [18]

SARS-CoV-2 широко распространился по всему миру (Рисунок 3), затронув по меньшей мере 227 стран, приведя в общей сложности к 765 903 278 подтвержденным случаям заражения и 6 927 378 случаям летального исхода [19].

По данным ВОЗ в Российской Федерации с 3 января 2020 г. до 10 мая 2023 г. было зарегистрировано 22 884 493 подтвержденных случая заболевания COVID-19 с 398 578 летальными исходами. Хотя заболевание COVID-19 получила статус пандемии, которая привела к глобальному кризису общественного здравоохранения с беспрецедентной заболеваемостью 5 мая 2023 ВОЗ объявило о завершении чрезвычайной ситуации в отношении COVID-19, снимая тем самым статус пандемии [20]. Тем не менее в мире все еще регистрируются новые случаи заболевания COVID-19 и данное заболевание все еще уносит жизни людей во всем мире.

### ***Морфология вируса SARS-CoV-2***

Семейство *Coronaviridae* представляют собой оболочечные вирусы, содержащие несегментированную, одноцепочечную (+)РНК длиной  $\approx 32$  килобаз, что является одним из самых больших из известных геномов РНК-вирусов (Рисунок 4) [21, 22, 23]. Коронавирусы относятся к подсемейству *Coronavirinae*

отряду *Nidovirales*. Подсемейство *Coronavirinae* состоит из четырех родов: альфакоронавирус, бетакоронавирус, дельтакоронавирус и гаммакоронавирус, при этом штамм SARS-CoV-2 классифицируется как бетакоронавирус на основании анализа последовательности генома [21, 24]. Известно, что геном коронавируса имеет 5'-кэп и 3'-поли (А) хвост; следовательно, при инфицировании организма геном действует как мРНК для трансляции полипротеинов репликазы, необходимых для репликации вируса [21, 22, 24].

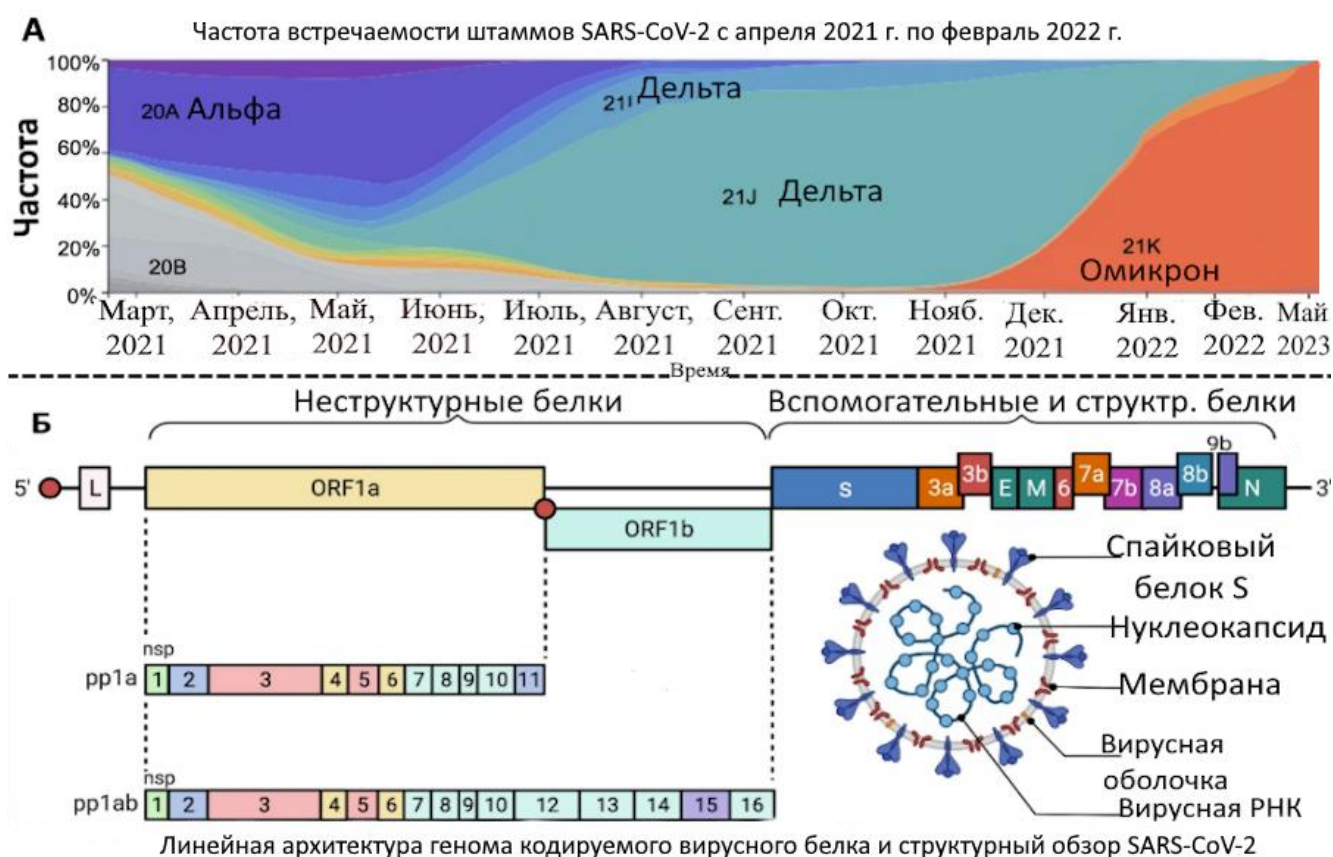


Рисунок 4 – Распространенность и архитектура генома SARS-CoV-2 [25]

В настоящее время точное число штаммов вируса SARS-CoV-2 трудно определить из-за его непрерывной эволюции. Однако, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) и другие агентства здравоохранения, активно отслеживают и классифицируют новые варианты коронавируса на основе их генетического состава и потенциального воздействия на общественное здоровье.

Морфологическое исследование вируса SARS-CoV-2 с помощью электронной микроскопии и NGS подтвердила, что вирус имеет общие структурные особенности и геномную организацию других бета-коронавирусов. Это плеоморфный оболочечный вирус (размер 60–140 нм), с характерными шипами на поверхности. Основным путем заражения вирусом SARS-CoV-2 связан с вирусным шиповым белком S, являющимся основным структурным белком, встроенным в мембрану вируса в гомотримерной форме. Данный вирусный шиповой белок использует различные механизмы для проникновения в клетки макроорганизма. Однако, основным рецептором для белка S является человеческий рецепторный Ангиотензин превращающий фермент 2 (АПФ2). Белок S состоит из двух субъединиц, S1 и S2, расщепляемых в организме фурином в сайте расщепления многоосновного фурина (Furin Cleavage Site, FCS). Дистальная субъединица S1 содержит две области, домен связывания рецептора (receptor-binding domain, RBD) и N-концевой домен (N-terminal domain, NTD) при этом RBD действует как область связывания для АПФ2. Известно, что связывание RBD с АПФ2 требует конформационной адаптации, а более легкий переход от «закрытой» к «открытой» конформации шипового белка интенсифицирует проникновение вируса. Таким образом, мутации в этом белке могут существенно влиять на конформацию и дальнейшее взаимодействие с АПФ2 или нейтрализующими антителами, ведя к более или менее контагиозным вариантам вируса [5, 20].

Как говорилось ранее, проникновение вируса в организм требует опосредованного фурином расщепления FCS, что обеспечивает слияние мембран. Отмечается, что FCS является ключевым фактором, определяющим контагиозность SARS-CoV-2, способствуя его эффективному распространению среди людей [26]. Структурное моделирование показало, что мутации или делеции в FCS значительно изменяют структуру петли расщепления, что, предположительно, влияет на связывание фурина. Это изменение может повлиять на способность вируса эффективно проникать в клетки хозяина [25]. В сочетании с другими мутациями, особенно с теми, которые усиливают связывание АПФ2,

мутации, оптимизирующие расщепление фурина, как полагают, способствовали повышению трансмиссивности [25].

Среди трех структурных белков: оболочки (Е), мембраны (М) и нуклеокапсида (N), кодируемые ORF4, ORF5 и ORF9, Е и М в основном участвуют в сборке вирионов, тогда как N образует структуру вирусного капсида, связанную с вирусной РНК, и облегчает упаковку генома. Данные белки играют значительную роль в репликации, сборке и высвобождении вируса. Мутации в их генах также могут влиять на вирулентность [27, 28].

### ***Мутагенез вируса SARS-CoV-2***

В процессе эволюции возбудители быстро мутируют, в результате чего происходит передача инфекции от животного к человеку с последующей диссеминацией. Мутация, рекомбинация, генетический дрейф и другие эволюционные механизмы в сочетании с экологическим давлением позволяют вирусам преодолевать защитные барьеры и иммунные реакции у новых макроорганизмов. В зависимости от степени передачи вируса могут возникать эпидемические вспышки, которые перерастают в пандемию.

Новые инфекционные агенты, в частности вирусы, более патогенны, поскольку у большинства людей еще не выработался коллективный иммунитет. Исследования последних десятилетий показали, что РНК-вирусы являются первичными этиологическими агентами новых патогенов человека, занимая до 44% всех новых инфекционных заболеваний (в разных исследованиях от 25% до 44%), которые наряду с бактериями (10% - 49%), преобладают среди других групп паразитов, таких как грибы (7–9%), простейшие (11–25%) и гельминты (3–6%) [29].

РНК-вирусы имеют более высокую вероятность заражения новых видов макроорганизмов из-за исключительно короткого времени генерации мутаций и более высоких темпов эволюции. Известно, что скорость мутаций РНК-вирусов может происходить на порядки выше, чем у клеток макроорганизмов. Семейство РНК-вирусов *Coronaviridae* является одной из наиболее репрезентативных моделей эволюции вирусов в природе [30]. Семейство *Coronaviridae*, обладая одним из крупнейших геномов среди РНК-вирусов, проявляет уникальные генетические

изменения, способствуя более эффективным формам передачи, расширяя ареал своих хозяев и генерируя множество вариантов благодаря своим репликационным характеристикам и высокой скорости мутации (Рисунок 5). Несмотря на то, что большинство мутаций не влияют на распространение вирусных частиц, некоторые из них облегчают передачу и адаптацию к новым макроорганизмам [30].

Для вируса SARS-CoV-2 частота мутаций составляла примерно две мутации в месяц. 14 декабря 2020 г. Соединенное Королевство (Великобритания) сообщило о первой мутации SARS-CoV-2 линии B.1.1.7, которая, по данным ВОЗ, стала известна как «альфа» вариант [31]. Альфа-вариант включает 17 мутаций (14 несинонимичных точечных мутаций и три делеции) в вирусном геноме. Среди них восемь мутаций находятся в спайковом белке S. 18 декабря 2020 года исследователи из Южной Африки сообщили о линии SARS-CoV-2 B.1.351 (также известной как 501Y.V2), которая, по данным ВОЗ, была обозначена как бета-вариант [32]. Бета-вариант включает девять мутаций в белке S, из которых три мутации расположены в RBD (Receptor-Binding Domain, RBD) [33]. Линия P.1, представляющая собой гамма-вариант согласно маркировке ВОЗ, была впервые обнаружена в Бразилии 2 января 2021 г. Гамма вариант содержит 10 мутаций в белке S и три из этих мутаций расположены в RBD, подобно бета-варианту [34]. 24 марта 2021 года в Индии впервые сообщалось о варианте SARS-CoV-2 с мутациями E484Q и L452R в спайковом белке [35]. В течение нескольких месяцев вариант был обнаружен в других странах и получил название линии B.1.617. 11 мая 2021 г. сублиния B.1.617.2, по данным ВОЗ была обозначена как дельта-вариант [36]. За короткий период дельта-вариант быстро распространился по всему миру и стал доминирующим штаммом во всем мире [37]. 26 ноября 2021 г. ВОЗ сообщила о новом штамме SARS-CoV-2, названном Омикрон. По сравнению с дельта-вариантом, Омикрон содержит в себе неклассические молекулярные изменения в геноме: сочетание делеций с одной вставкой и значительно увеличенный мутационный ландшафт в области спайковых белков S1 и S2 соответственно, а также мутации в области рецептор-связывающий домена (RBD) [37]. По состоянию на 2024 год преобладающим штаммом является подвид

Омикрон EG.5, также известный как «Эрис» [38]. Благодаря мутации F456L в спайковых белках вируса, вариант EG.5 получил конкурентное преимущество по сравнению с другими циркулирующими штаммами из-за его повышенной трансмиссивности [38].

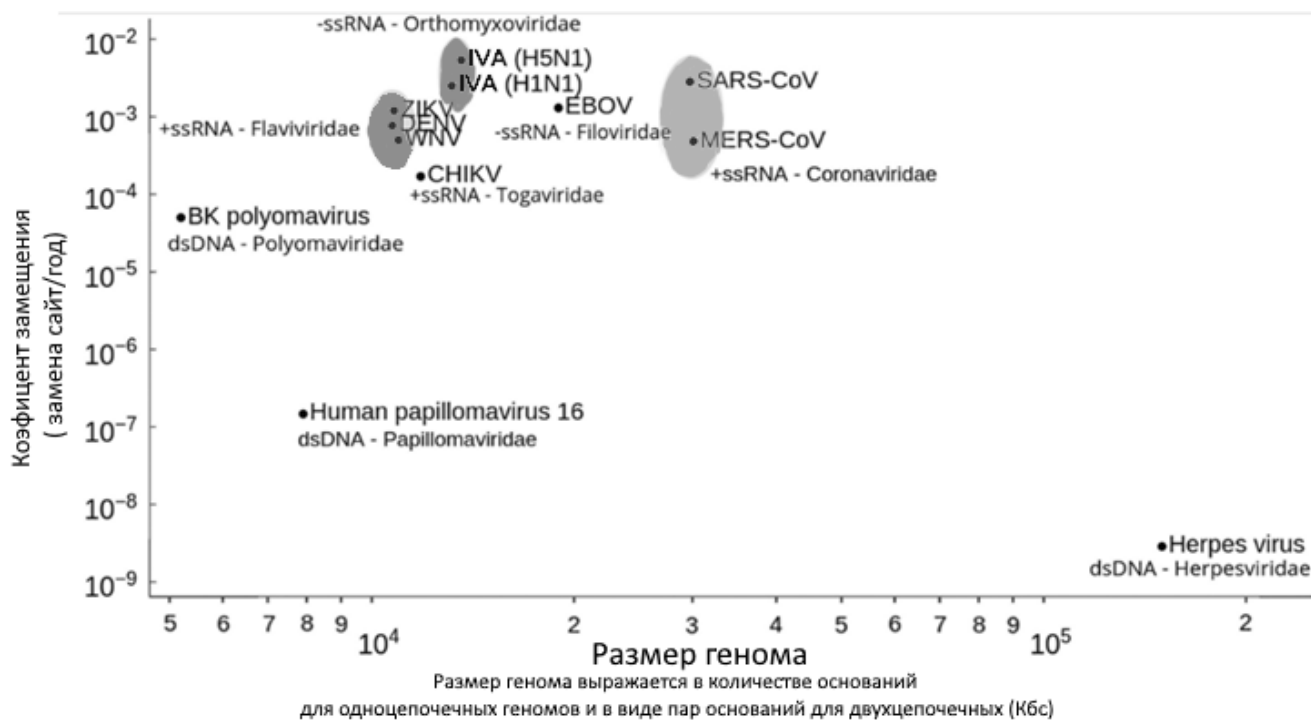


Рисунок 5 – Размер генома в зависимости от скорости мутаций ДНК и РНК-вирусов [25]

В работе [39] отмечается, что большинство мутаций в последовательности генома SARS-CoV-2 влияют не только на функциональные характеристики и вирулентность, но и на тяжесть заболевания и клинические проявления.

### ***Клинические проявления COVID-19***

Заболевание COVID-19, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, имеет широкий спектр клинических проявлений, которые могут варьироваться от легких симптомов до тяжелых состояний. Важно отметить, что некоторые пациенты могут не показывать визуализируемые симптомы, однако могут оставаться носителями вируса и передавать инфекцию другим.

Как видно из Рисунка 6, процесс инфицирования и возникновения заболевания SARS-CoV-2 можно приблизительно разделить на три фазы:

1. Бессимптомная фаза с обнаруживаемым вирусом или без него;
2. Нетяжелая симптоматическая фаза с поражением верхних дыхательных путей;
3. Тяжелая фаза, потенциально смертельное заболевание с гипоксией, инфильтратами «матового стекла» в легких и прогрессированием до острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) с высокой вирусной нагрузкой.

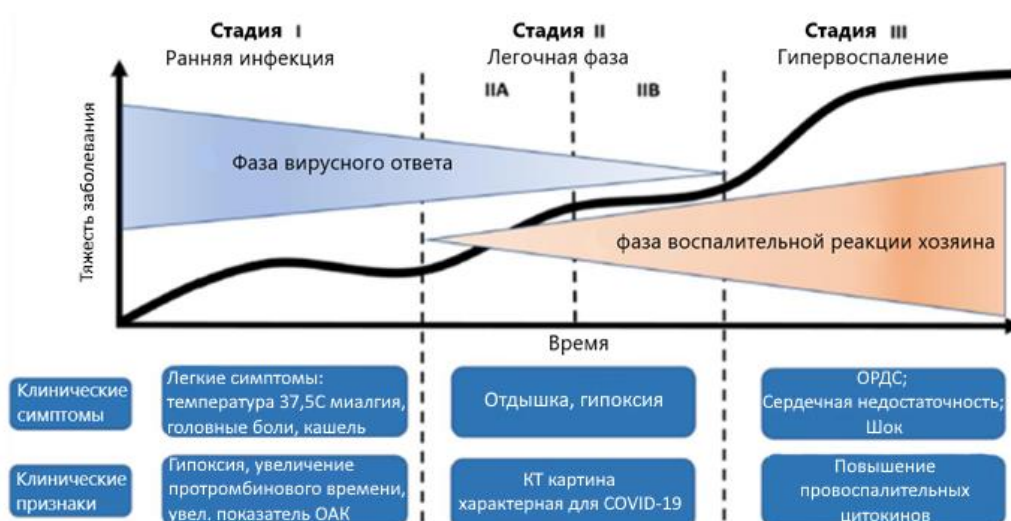


Рисунок 6 – Патогенные фазы COVID-19 и потенциальные терапевтические мишени [40; 41]

К типичным симптомам COVID-19 относятся лихорадка, сухой кашель, миалгия, боль в области грудной клетки и утомляемость. В более тяжелых случаях может развиваться острый респираторный дистресс-синдром [40, 41]. Помимо этих клинических симптомов, также сообщается и о обонятельной дисфункции и гипогевзии, как о частых проявлениях COVID-19. Хотя большинство обонятельных дисфункций, связанных с COVID-19, по-видимому, восстанавливаются в течение короткого периода времени, некоторые заболевшие сообщают о длительной anosмии продолжительностью более 30 дней [42]. Так же вирус SARS-CoV-2 может вызывать либо прямое цитопатическое повреждение эпителиальных и эндотелиальных клеток кишечника, либо не прямое

иммуноопосредованное повреждение, вызывая глубокие изменения кишечной микрофлоры на филогенетическом и метаболическом уровнях (дисбактериоз), которые сопровождаются нарушением местных иммунных реакций. Явление цитокинового шторма является причиной наиболее тяжелых форм инфекции SARS-CoV-2 [43].

В то время как у детей и молодых людей, заболевание протекает бессимптомно, пожилые люди и/или люди с сопутствующими заболеваниями подвергаются более высокому риску развития тяжелого течения заболевания, включающий в себя дыхательную недостаточность, а в редких случаях и полиорганную недостаточность, приводящей к летальному исходу. Инкубационный период составляет ~ 5 дней, тяжелая форма заболевания обычно развивается через ~ 8 дней после появления симптомов, а критическое состояние с последующим летальным исходом наступает примерно через  $15 \pm 1$  дней [43].

Поскольку у заболевших пациентов происходит дисфункция, нарушение регуляции различных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, можно говорить о том, что пневмония, вызванная SARS-CoV-2, является иммуноопосредованным заболеванием [44].

## **1.2. Иммунитет слизистых оболочек**

### ***Эпителиальный барьер***

Для предотвращения вирусной инфекции в организме существует несколько уровней барьерной защиты, одним из которых выступают клетки слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Слизистый барьер функционирует как первая линия защиты, обеспечивая первоначальный контакт с распространёнными инфекционными агентами, аллергенами и канцерогенными веществами. Большая часть патогенных организмов угнетается за счет локальных реакций врожденного иммунитета.

На сегодня известно, что слизистая оболочка, выстилающая органы изнутри, состоит из трёх слоев: эпителий собственных органов; рыхлая соединительная

ткань, состоящая из желез, лимфоидных образований, которые формируют лимфоидные узлы – собственная пластина (лат.) *lamina propria*; мышечная пластинка *lamina muscularis*, которая представлена гладкими мышцами [45]. Строение слизистых оболочек обеспечивает первую линию защиты от патогенов: обеспечение реакций активации врожденного и адаптивного иммунитета, в том числе и обеспечение толерантности к микробиому [46]. Морфологические особенности и функциональное обеспечение слизистых позволяет разделить всю слизистую оболочку на два типа. Как видно из Рисунка 7, слизистые первого типа – некоторые слизистые оболочки пищеварительной системы, дыхательной системы, слизистые оболочки верхних отделов женской уrogenитальной системы, в то время как к слизистым второго типа относят клетки роговицы, слизистые оболочки ротовой полости, пищевода, слизистые оболочки нижних отделов женской уrogenитальной системы [45].

### Мукоза ассоциированная лимфоидная ткань MALT



### Морфологические особенности слизистых оболочек

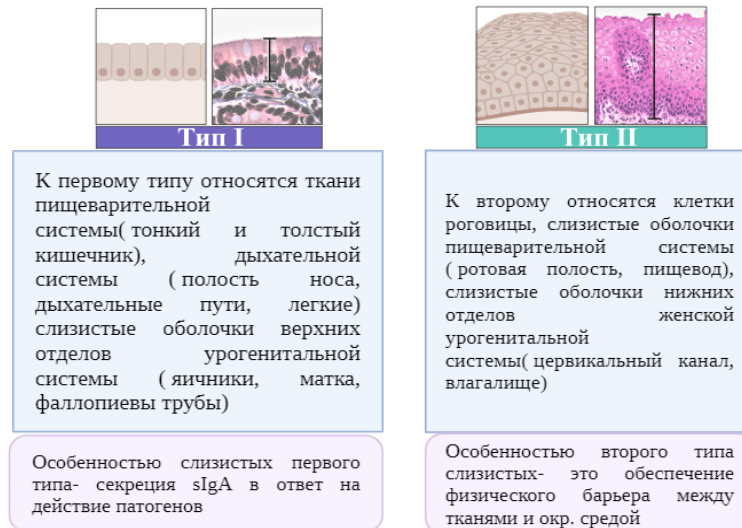


Рисунок 7 – Классификация слизистых оболочек

Особенностью слизистых первого типа – секреция sIgA в ответ на действие патогенов. Большая часть эпителиальных клеток экспрессирует неонатальный рецептор, который участвует в транспорте sIgA через эпителий в ответ на действие чужеродного агента [47, 48].

Особенность второго типа слизистых – это обеспечение физического барьера между тканью и окружающей средой, так как к слизистым второго типа относятся ткани, которые находятся в максимальном контакте с окружающей средой и различными антигенами (например: пищеварительные, пыльцевые антигены) [45, 47].

Иммунная система слизистой оболочки отвечает, как за опосредованные симбиотических отношений между хозяином и эндогенными микроорганизмами,

так и за функционирование в качестве первой линии физической и иммунологической защиты от вторжения патогенных микроорганизмов. Благодаря врожденному и приобретенному компонентам, иммунная система слизистой оболочки поддерживает иммунологический гомеостаз по обширному пространству поверхности эпителия, от полости рта и носа до дыхательных, кишечных и мочеполовых путей [49].

Эпителиальные клетки, которые покрывают обширную площадь поверхности слизистых оболочек, интегрированы в иммунитет слизистой оболочки не только как механические барьеры, но и как активные продуценты врожденных иммунных факторов (например: лизоцима, лактоферрина, пероксидазы, дефензинов, компонентов комплемента и многочисленных цитокинов), как клетки, участвующие в транспорте антител всех трех основных изотипов иммуноглобулина (Ig), так и антиген-процессирующие и презентующие клетки обеспечивая защитные реакции врожденного и адаптивного иммунитета [45] (Рисунок 8).

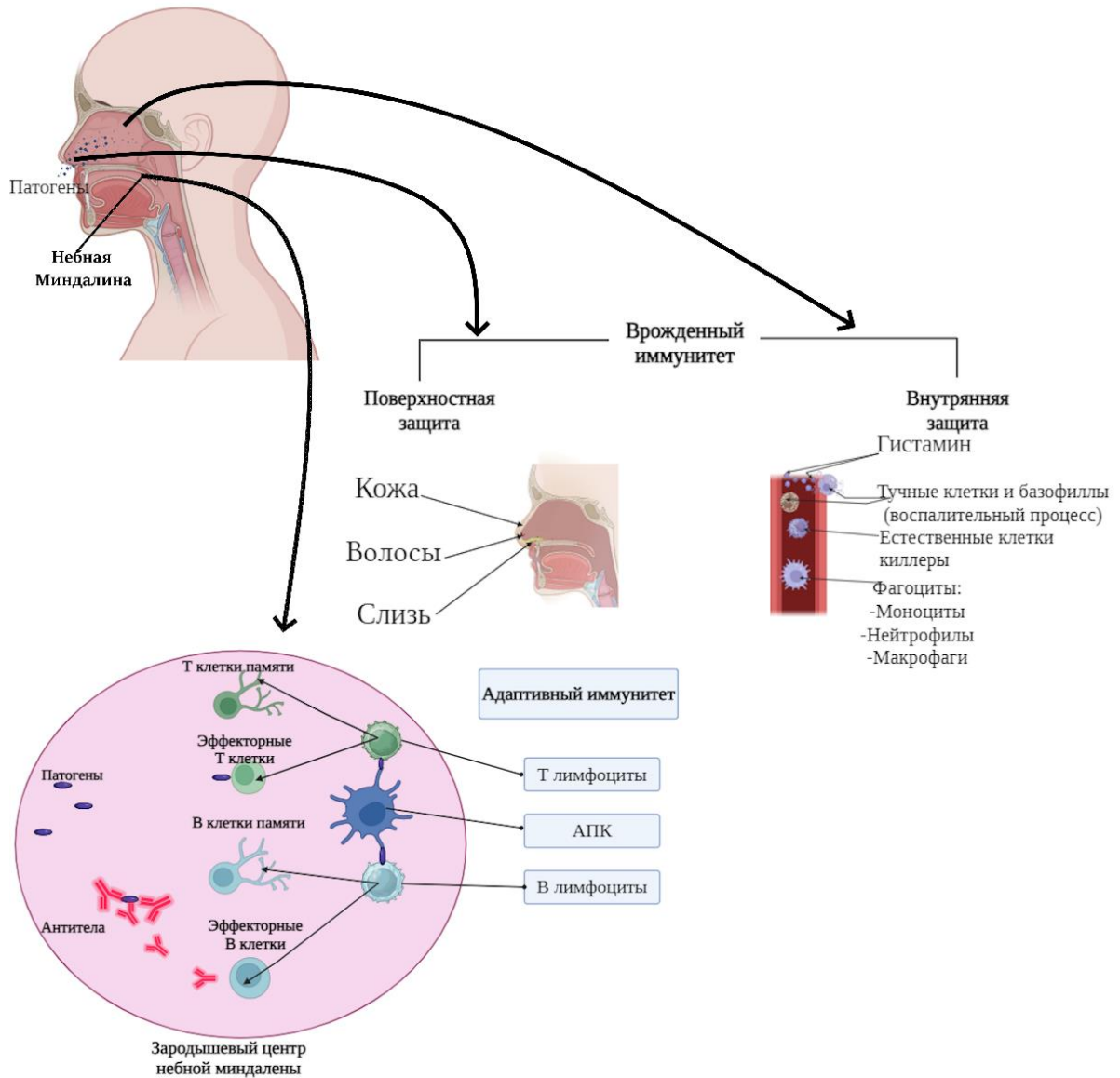


Рисунок 8 – Факторы врожденного и адаптивного иммунитета на поверхности слизистой NALT

Данные защитные функции обеспечиваются организованной лимфоидной тканью, ассоциированной со слизистой оболочкой (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) [50]. В зависимости от анатомического расположения этой лимфоидной ткани выделяются несколько категорий: TALT, включающая носоглотку, евстахиеву трубу и ухо; NALT, охватывающая носовую полость, рот, ротоглотку и конъюнктиву; а также GALT и SALT, представляющие кожу (дерму), и BALT, состоящий из эпителиоцитов трахеи, бронхов, легких и грудных желез (у женщин) [51, 52]. Все эти структуры составляют единую систему мукозального иммунитета, потому что каждая такая структура не автономна, а имеет единое

происхождение иммуноцитов и единую рециркуляцию лимфоидных клеток, что дает право говорить о единой и общей системе мукозального иммунитета CMIS (common mucosal immune system) [47, 48, 50] (Рисунок 9). Единая система мукозального иммунитета CMIS соединяет эти участки с эффекторными сайтами (такими как *lamina propria*, дыхательные пути и ткани желез) для формирования иммунного ответа, который функционирует в качестве первой линии защиты на поверхностях слизистой оболочки [50].

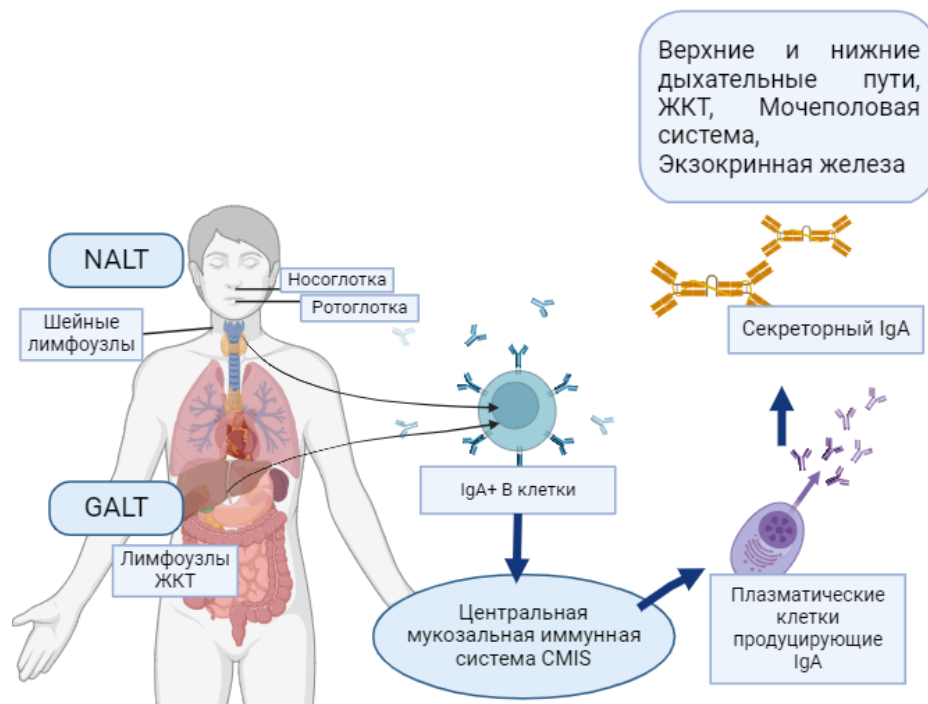


Рисунок 9 – Организация единой системы мукозального иммунитета CMIS

Проникновение и распознавание вируса начинается на поверхности слизистых оболочек верхних дыхательных путей (ВДП), особенно в носоглотке. Прайминг антигена в ВДП ведет к формированию динамической иммунной сети, построенной на специфическом иммунном ответе слизистой оболочки (врожденной и адаптивной).

### ***Имунопатогенез COVID-19***

Вирус SARS-CoV-2 проникает в организм через эпителиальные клетки слизистой оболочки респираторного тракта. На поверхности клеток

респираторного тракта рецепторные молекулы врождённого иммунитета распознают патогены и активируются механизмы передачи сигнала. Вирус SARS-CoV-2 связывается с рецепторами, которые широко представлены на поверхности клеток легких, а также на клетках сердечно-сосудистой, почечной и других систем. Это связывание инициирует инфекционный процесс и приводит к репликации вируса в клетках.

При первичном контакте с вирусом активируются эффекторные молекулы врожденного иммунитета, который включает в себя выработку интерферонов (например, IFNs), которые играют ключевую роль в противовирусной защите, усиливая противовирусный ответ и активируя другие клетки иммунной системы и активацию макрофагов и нейтрофилов, которые элиминируют вирус из организма вирус и выделяют про-воспалительные цитокины, что может привести к усилению воспалительной реакции. В некоторых случаях иммунный ответ может быть чрезмерным и привести к цитокиновому шторму. Перепроизводство про-воспалительных цитокинов может вызвать системное воспаление, что приводит к повреждению тканей и органам, таких как легкие (острый респираторный дистресс-синдром - ОРДС), печень и почки.

Помимо активации врождённого иммунитета при инвазии вируса SARS-CoV-2 происходит активация адаптивного иммунитета, который включает в себя: быстрое образование антител и активацию Т клеток. В легочной ткани плазмоциты, вырабатывают антитела против SARS-CoV-2 (IgM и IgG и др.), которые нейтрализуют вирус. В то время как CD4<sup>+</sup> Т-хелперы помогают активировать В-клетки, CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки уничтожают инфицированные клетки.

Как было сказано ранее, основными зонами проникновения вируса SARS-CoV-2, являются слизистые оболочки верхних дыхательных путей (ВДП), рот, носоглотка и др. [51, 52]. Таким образом, данные слизистые оболочки обеспечивают первую линию защиты от инфекции. Ограничение распространения вируса в нижние дыхательные пути и предотвращение прогрессирования заболевания в организме достигается в первую очередь на уровне иммунитета

слизистых оболочек дыхательных путей. Несмотря на это, почти все исследования иммунного ответа при COVID-19 сосредоточены исключительно на сывороточных антителах и системном клеточно-опосредованном иммунитете. Для разработки тактики лечения и предупреждения заболевания особенно важно детально изучить механизм взаимодействия вируса с как врожденными, так и адаптивными звеньями иммунитета слизистых оболочек.

### ***Механизмы врожденного иммунитета при инвазии вирусом SARS-CoV-2***

Иммунный ответ на вирусные инфекции инициируется врожденной иммунной системой, которая распознает патогены и индуцирует выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов [53]. Врожденные иммунные реакции ограничивают проникновение, трансляцию, репликацию и сборку вируса, помогают идентифицировать и удалять инфицированные клетки, а также координируют и ускоряют развитие адаптивного иммунитета. Рецепторы распознавания образов (Pattern Recognition Receptors, PRRs) на поверхности клеток, эндосомы и цитозоля реагируют на молекулярные паттерны (например, вирусная РНК или окисленные фосфолипиды и др.), ассоциированные с патогенами (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), вызывая воспалительные реакции и активируя механизмы программируемой гибели клеток, которые ограничивают вирусную инфекцию и способствуют элиминации патогенов в том числе и вирусов. Рецепторы распознавания образов на поверхности клеток такие как Toll-подобные рецепторы (Toll like receptors, TLRs), рецепторы, подобные генам и другие инициируют иммунный ответ на вирусные инфекции [54, 55].

Среди рецепторов врожденного иммунитета выделяют Toll-подобные рецепторы. TLRs представляют собой трансмембранные белки типа I семейства рецепторов интерлейкина-1 (IL-1R), которые обладают N-концевым доменом с богатым лейцином повтором (Leucin-rich repeat domain, LRR) для связывания лигандов, одним трансмембранным доменом и C-терминальным внутриклеточным сигнальным доменом, которые играют ключевую роль в иммунном ответе против микробов. На сегодняшний день идентифицировано десять TLRs человека, а подмножество TLRs распознает формы нуклеиновых кислот, включая

двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК и ДНК. TLRs локализуются на поверхности клетки, как, например, в случае TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10, или имеют эндосомальную локализацию как TLR 3, 7, 8, 9 [55] (Рисунок 10).

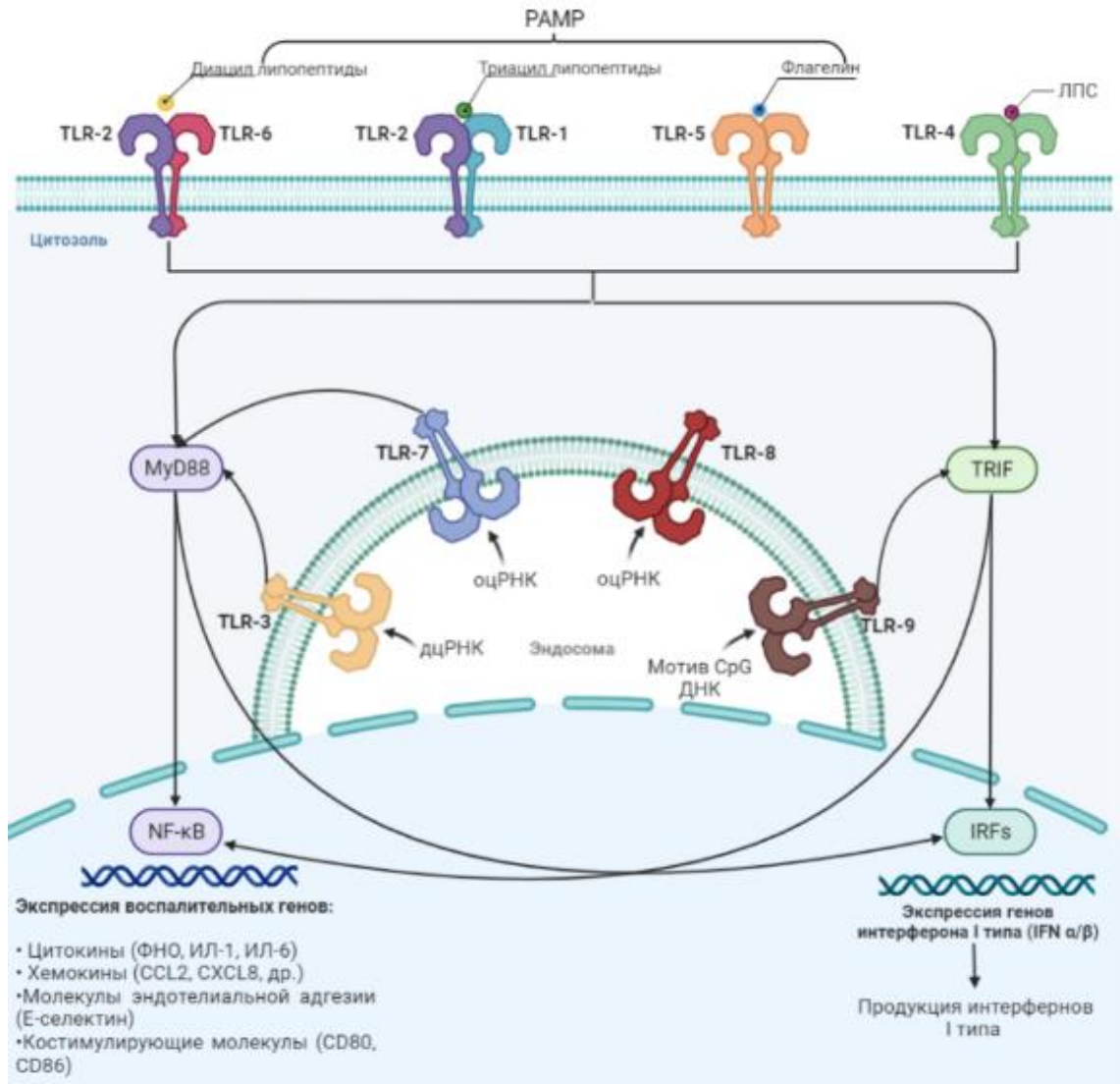


Рисунок 10 – Механизмы внутриклеточной передачи сигнала посредством TLRs

TLRs состоят из внеклеточного домена, одного трансмембранного домена и внутриклеточного домена и обычно классифицируются как рецепторы распознавания образов (PRRs), поскольку они распознают консервативные молекулярные паттерны в патогенах, называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMPs) [54].

Следовательно, активация TLRs приводит к элиминации патогенов, индукции эффекторных молекул и вовлечения остальных компонентов иммунной

системы [46, 54, 55]. Последние исследования показали, что Toll-подобные рецепторы, в частности TLR3 и TLR7, играют решающую роль в иммунном ответе против SARS-CoV-2. Эти рецепторы участвуют в обнаружении вирусных патогенов и запуске врожденных иммунных реакций, которые являются первой линией защиты организма от инфекций.

### ***TLR3***

TLR3 распознает двухцепочечную РНК (дцРНК), которая является промежуточным звеном репликации вируса, и инициирует нисходящую передачу сигнала, тем самым повышая экспрессию IFN- $\alpha/\beta$  и индуцируя активность синтеза антивирусного белка (Antiviral Peptide, AVP) [56, 57]. TLR3 является рецептором, который зависит от TRIF, чтобы индуцировать продукцию IFN- $\beta$ . В соответствии с различными последующими продуктами, активируемыми TRIF, сигнальный путь, опосредуемый TLR3, можно разделить на путь TRIF-зависимого ядерного фактора транскрипции- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) и путь TRIF-зависимого IFN-регуляторного фактора 3/7 (IRF3/7) [56]. После активации на плазмалемме экзогенной дцРНК TRIF взаимодействует с фактором некроза опухоли (TNF), рецептор-ассоциированным фактором 3 (TRAF3) и TRAF6, запуская серию каскадных реакций. TLR3 состоит из N-концевого эктодомена (extracellular cadherin domain, ECD), цитоплазматического домена TIR, трансмембранного домена и двух фланкирующих областей, известных как лейцин-богатые повторы (LRR), C-концевой (LRR-CT) и N-концевой (LRR-NT). Общими лигандами к TLR3 являются участки с поли(I:C), дцРНК -вирусах (например, ротавирусе (RV), респираторно-синцитиальном вирусе (RSV), мышинном цитомегаловирусе (MCMV)) и вирусе с одноцепочечной РНК (ssRNA) например, вирус Западного Нила [56, 58, 59]. Недавнее исследование показало, что эндотелиальный TLR3 может также обнаруживать внеклеточную дцРНК, которая секретируется из высоко метастатических опухолей [56]. TLR3 существует в виде мономера и мембранного рецептора в покоящихся клетках и димеризуется только при связывании с лигандами посредством своего ECD [59]. Когда TLR3 связывается

с дцРНК, образуется сигнальный комплекс дцРНК-TLR3, состоящий из одной дцРНК и двух молекул TLR3. Молекулярная структура сигнальной единицы (SU) показывает, что лиганды дцРНК связываются с двумя областями: одна на С-конце (LRR19–LRR21), а другая вблизи N-конца (LRR-NT и LRR1–LRR3) [56, 59, 60]. TLR3 связывается с лигандами исключительно через поверхностные контакты (в основном водородные связи и электростатические взаимодействия), тогда как белок-белковые взаимодействия происходят только на LRR-CT в комплексе TLR3-дцРНК [61]. При активации TLR3 рекрутирует TRIF для запуска нижестоящего сигнального каскада [54]. В отличие от других членов семейства TLRs, TLR3 полностью зависит от TRIF [61]. Этот сигнальный путь в конечном итоге активирует факторы транскрипции, а именно IRF3/7, NF-κB и белок-активатор 1 (AP-1), тем самым опосредуя выработку интерферонов I типа, провоспалительных цитокинов и хемокинов соответственно после активации TLR3 [56]. Путь TLR3 может контролировать иммунитет к большинству клинически значимых вирусных инфекций у людей, в том числе вызванных флавивирусами, вирусами гепатита, герпесвирусами, ретровирусами, вирусом энцефаломиокардита, ортомиксовирусами и эпидемическими вирусами, такими как SARS-CoV-2.

### ***TLR7***

Другой рецепторной молекулой врожденного иммунитета является TLR7, который так же содержит N-концевой эктодомен (ECD) с богатыми лейцином повторами (LRR), участвующими во взаимодействии TLR-лиганд, и цитозольный домен Toll-интерлейкин-1 (TIR), ответственный за активацию компонентов сигнального пути [62]. После стимуляции лигандом TLR7 образует m-образный димер, содержащий два сайта связывания лиганда [63]. Интересно, что первого сайта достаточно для активации рецептора, тогда как второй сайт усиливает аффинность связывания лиганда, связанного с первым сайтом. Кроме того, каждый сайт связывания лиганда предпочтительно распознает разные фрагменты: гуанозин или богатую уридином оцРНК, что указывает на то, что TLR7 является двойным

рецептором. После активации лигандом TLR7 связывается с адаптерным белком первичной реакции миелоидной дифференцировки (MyD) 88 через внутриклеточный домен, в то время как TLR3 соединяется с другим адаптерным белком, TIR-домен-содержащим адаптер-индуцирующим интерфероном- $\beta$  (TRIF), через TIR-домен [64]. Такие взаимодействия инициируют сигнальные каскады, которые способствуют ядерной транслокации ядерного фактора каппа В (NF- $\kappa$ B), регуляторного фактора интерферона 3 (IRF3), IRF7 и факторов транскрипции белка-активатора 1 (AP-1) [65]. Конечная цель направлена на транскрипцию генов и экспрессию цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ), IL-6, индуцируемый интерфероном белок 10 (IP-10) и тип I-интерфероны (IFNs) (IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ) [64]. Конститутивная экспрессия TLR7 преобладает в плазмацитоидных и миелоидных дендритных клетках (pDCs и mDCs), В-клетках и моноцитах [63; 66]. Низкие уровни TLR7 также наблюдались на уровне слизистых оболочек респираторной системы [65, 66, 67, 68].

Фактически, все клетки, включая клетки альвеолярного и респираторного эпителия, имеют внутриклеточные рецепторы распознавания патогенов, которые распознают вирусы, нуклеиновые кислоты или интермедиаты репликации и либо непосредственно препятствуют репликации вируса, либо запускают экспрессию эффекторных молекул, включая противовирусные гены [69] (Рисунок 11). Например, молекулы RIG-I и MDA5 распознают различные формы внутриклеточной вирусной РНК и действуют через MAVS [70]. Одним из основных результатов после внутриклеточного распознавания вирусной инфекции является выработка IFNs [70, 71, 72, 73].

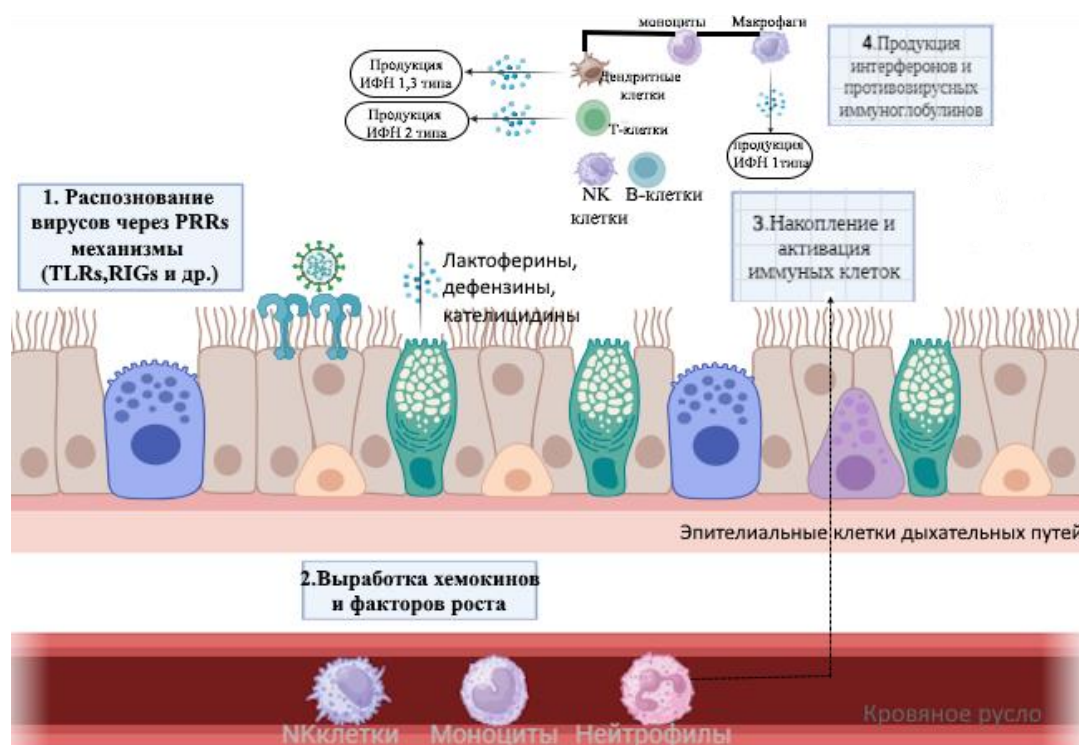


Рисунок 11 – Стадии иммунного ответа при проникновении вирусных частиц на поверхность слизистой оболочки

## *IFNs*

Известно, что интерфероны (IFNs) участвуют в иммунных реакциях при вирусных инфекциях и способствуют как индукции, так и регуляции врожденных и адаптивных противовирусных механизмов. Семейства IFNs классифицируются на IFN типа I (IFN -  $\alpha/\beta$ ), IFN типа II (IFN -  $\gamma$ ) и IFN типа III. Интерфероны III типа (или IFN- $\lambda$ ) выявлены относительно недавно. К IFN III относят: IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 и IFN- $\lambda$ 3 [74]. Хотя структурно и функционально IFN- $\lambda$  родственен IFN I типа, их выделяют в отдельное семейство, которое передает сигнал через отдельный рецепторный комплекс. Классификация IFNs на типы основана на строении рецепторного комплекса, используемого для передачи сигналов, а также на гомологии их последовательностей [75].

Известно, что IFN- $\alpha/\beta$  являются быстро реагирующими молекулами, которые вырабатываются в ответ на взаимодействие вирусных структур (ДНК CpG или дцРНК) с клеточными рецепторами распознавания образов (PRRs), такими как маннозные рецепторы, Toll-подобные рецепторы (TLRs) и цитозольные рецепторы

[76]. Кроме того, возможен путь стимуляции через Т-клеточные рецепторы (TCR) и рецепторы естественных клеток-киллеров (NK). Как известно, IFN I типа индуцируется не только рецептор-опосредованной стимуляцией, но и в ответ на ранее продуцируемые цитокины, включая интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-18 (IL-18) и IFN-  $\alpha/\beta$  [46, 69, 72]. После этого активируются факторы транскрипции, необходимые для экспрессии генов IFN -  $\alpha/\beta$ , таких, как регуляторный фактор IFN -3 (IRF-3), IRF-5, IRF-7 и NF- $\kappa$ B [75], тем самым активируя JAK-STAT сигнальный путь. Данная активация приводит к индукции многочисленных внутренних противовирусных факторов, таких как РНК-активируемая протеинкиназа (PKR), 2-5A, белки Mx и несколько путей апоптоза.

Немаловажную роль играет способность семейства интерферонов модулировать различные аспекты адаптивного иммунитета. Например, IFN I и II типа влияют на активность макрофагов, NK-клеток, дендритных клеток (DC) и Т-клеток, усиливая презентацию антигена, транспортировку клеток, а также профили клеточной дифференцировки и экспрессии [75]. В свою очередь IFN  $\lambda$ , может ингибировать пролиферацию клеток, стимулировать их апоптоз, что играет важную роль в регуляции нейтрофилов и секреции Th2 цитокинов [77]. Таким образом, индукция интерферонов является ключевым событием при вирусных инфекциях, и их регуляция контролируется на различных уровнях.

Нарушение баланса в противовирусном ответе на ранних стадиях инфекции SARS-CoV-2 для пациента может иметь решающее значение для лучшей стратификации пациентов и предоставления индивидуальных вариантов лечения, тем самым предотвращая развитие иммунопатологий, как основы для тяжелого течения заболевания [58, 59].

В качестве стратегии уклонения от иммунного ответа вирус SARS-CoV-2 использует многокомпонентную стратегию противодействия системе IFNs с клиническими последствиями в виде недостаточного ответа IFN типа I, который был обнаружен в ранних исследованиях COVID-19 [7, 54, 56]. Было идентифицировано не менее десяти белков SARS-CoV-2, которые противодействуют противовирусному действию IFNs [78]. Один из них,

неструктурный белок 16 (NSP16), полученный из SARS-CoV-2, который подавляет сплайсинг мРНК, снижает распознавание вирусной РНК внутриклеточными геликазными рецепторами и приводит к ингибированию трансляции мРНК за счет связывания с 18S рибосомной РНК. Кроме NSP16 в системе противодействия участвуют белки NSP8 и NSP9, которые препятствуют переносу белка клетки макроорганизма на клеточную мембрану. Все вышеперечисленные механизмы независимо друг от друга приводят к снижению продукции IFNs пораженной клеткой [79, 80]. Таким образом, нарушается гомеостаз между взаимодействием эффекторных молекул врожденного иммунитета, вызывая недостаточную или чрезмерную реакцию сигнальных молекул, которое приводит к ухудшению состояния пациентов с COVID-19. Хотя IFNs в первую очередь противовирусные компоненты врожденного иммунитета, они также могут влиять на выработку интерлейкинов. Так, например, IFN $\lambda$ , может усиливать выработку как провоспалительных цитокинов (например, IL6, TNF- $\alpha$  и др.), так и противовоспалительных факторов (например, IL10 и др.) [81, 82].

### ***IL-1 $\beta$***

После активации рецепторных молекул врожденного иммунитета происходит индукция про/противо воспалительных факторов, одним из которых выступает интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ). Данный провоспалительный цитокин, играет ключевую роль в иммунном ответе организма на инфекции, включая заболевание COVID-19. При заболевании COVID-19 IL-1 $\beta$  является одним из ключевых цитокинов, участвующих в реакции организма на вирус SARS CoV-2 [81]. Иницируя воспаление во время заболевания COVID-19, IL-1 $\beta$  играет роль в активации инфламмасом и последующим высвобождении провоспалительных цитокинов. Исследования показали повышенную экспрессию IL-1 $\beta$  после активации инфламматомы NLRP3 и каспазы-1 в различных иммунных клетках, включая очищенные мононуклеарные клетки периферической крови, субпопуляции гранулоцитов и Т-клетки. Высокий уровень экспрессии наблюдался как *in vitro*, так и в моделях прямого заражения SARS-CoV-2 [83, 84]. Избыточная

экспрессия и продукция  $IL-1\beta$  и других провоспалительных цитокинов может привести к «цитокиновому шторму», характеризующемуся тяжелым системным воспалением. Это состояние может вызвать повреждение органов и тканей организма и коррелирует с летальными исходами у пациентов с заболеванием COVID-19 [85].

### *IL-18*

Еще одним представителем семейства интерлейкинов, играющий важную роль в иммунном ответе, особенно при заболевании COVID-19, является интерлейкин 18 (IL18). IL-18 вырабатывается различными клетками, включая макрофаги, дендритные клетки и кератиноциты, и функционирует как провоспалительный цитокин. мРНК IL-18 экспрессируется в широком диапазоне клеток, включая клетки Купфера, макрофаги, Т-клетки, В-клетки, и др., а также эпителиальные клетки верхних дыхательных путей [86]. Эпителиальные клетки дыхательных путей могут сами экспрессировать IL-18, что указывает на локальную роль этого цитокина. Он имеет структурное сходство с  $IL-1\beta$  и может активировать тот же рецептор, IL-1R, хотя он связывается с другой субъединицей, IL-18R [86, 87].

IL-18 способствует выработке интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) естественными киллерами (NK) и естественными Т киллерами (NKT), усиливая иммунный ответ, что имеет решающее значение для способности организма элиминировать вирусные инфекции [88]. С другой стороны, избыточная экспрессия и продукция IL-18 может способствовать развитию гиперовоспалительной реакции, наблюдаемой в тяжелых случаях COVID-19. Повышенная экспрессия IL-18 связана с развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), тяжелого осложнения COVID-19, характеризующегося диффузным воспалением и повреждением альвеол в легких [88, 89].

Таким образом, IL-18 проявляет свое плейотропное действие, что указывает на его важную патофизиологическую роль при заболевании COVID-19.

### ***TNF- $\alpha$***

Другой эффекторной молекулой врожденного иммунитета, играющий роль в системном воспалении и участвует в регуляции реакций иммунной системы на инфекцию является фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ). Избыточное высвобождение провоспалительных цитокинов, включая TNF- $\alpha$  приводит к развитию тяжелого течения заболевания COVID-19. Повышенная экспрессия TNF- $\alpha$  была определена как независимый фактор риска смерти среди тяжелобольных пациентов с COVID-19, что подчеркивает ее важность в прогрессировании и тяжести заболевания [82, 90]. Чрезмерное высвобождение TNF- $\alpha$  и других цитокинов приводит к «цитокиновому шторму», характеризующемуся системным воспалением. В дальнейшем, «цитокиновый шторм» может привести к повреждению легочной ткани, способствуя воспалению и гибели клеток. Активируя сигнальные пути TNF- $\alpha$ , увеличивает проницаемость сосудов и привлечение нейтрофилов, что приводит к повреждению альвеол, приводя к разрушению легочной ткани, что приводит к гипоксии и еще больше усугубляет состояние пациента. Стоит отметить, что высокая продукция и экспрессия TNF- $\alpha$  также может быть связана с неврологическими осложнениями, наблюдаемыми у некоторых пациентов с COVID-19, из-за его воздействия на гематоэнцефалический барьер и нейрональные клетки [91].

Влияя на механизмы регуляции воспалительной реакции TNF- $\alpha$  может привести к иммунной дисрегуляции, когда иммунный ответ организма становится несбалансированным, что потенциально способствует сохранению гипервоспалительной реакции тем самым пролонгируя заболевание COVID-19.

### ***Противомикробные пептиды***

Помимо провоспалительных цитокинов другими эффекторными молекулами врожденного иммунитета слизистых оболочек выступают антимикробные пептиды. Эпителиальные клетки дыхательных путей состоят из эпителиоцитов и слизи, в которой растворены антимикробные пептиды (Antimicrobial peptides,

AMPs) и ферменты, играющие решающую роль в качестве первой линии защиты организма.

Двумя основными группами катионных противомикробных пептидов, которые интегрированы во врожденный иммунитет на поверхности слизистых оболочек, являются кателицидины и дефензины (Рисунок 12) [92].

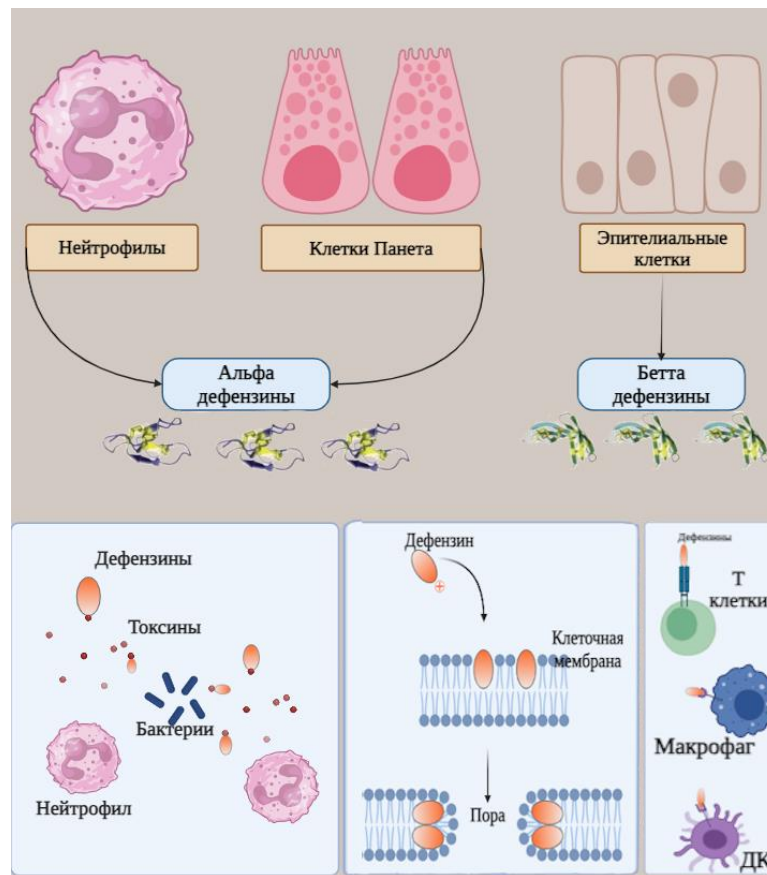


Рисунок 12 – Дефензины – как факторы врожденного иммунитета на поверхности слизистого эпителия

На сегодняшний день, класс антимикробных пептидов широко рассматриваются не только как многообещающее решение для борьбы с патогенными микроорганизмами, но и как противовирусное средство [93]. Известно, что антимикробный эффект АМП действует либо на мембрану различных патогенных микроорганизмов, включая бактерии, грибки и вирусы, либо модулирует врожденный иммунный ответ у организмов [93]. В зависимости от вида патогена АМП могут экспрессироваться либо конститутивно, либо индуцируемо [94]. Противовирусная активность АМП проявляется в зависимости

от их действия за счет адсорбции на поверхности вируса и процесса проникновения или непосредственного воздействия на вирусную оболочку [95]. Например, положительно заряженные остатки АМП позволяют им электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами клеточной поверхности, такими как гепарансульфат. Гепарансульфат состоит из молекул гликозаминогликанов, которые тесно связаны с прикреплением вируса [96]. Было доказано, что АМП, блокирующие гепарансульфат, должны снижать вирусную инфекцию [97]. Кроме того, противовирусный эффект АМП связан с их способностью ингибировать распространение вируса от клетки к клетке через плотные контакты (межклеточное распространение) или ингибировать образование синцитий [98]. Иммуногистохимические исследования показывают, что  $\beta$ -дефенсины, в частности HBD2, конститутивно экспрессируются в слизистой оболочке полости рта здоровых людей, создавая барьер через эпителий. Считается, что АМП играют очень важную роль в защите от респираторных инфекций [99, 100]. Например, известно, что измененная экспрессия HBD-2 в респираторном эпителии связана с патогенезом нескольких респираторных заболеваний, таких как астма, легочный фиброз, пневмония, туберкулез и ринит [94, 101]. Было показано, что HBD-2 ингибирует инфекцию респираторно-синцитиального вируса человека (RSV), блокируя проникновение вируса посредством дестабилизации/десинтеграции вирусной оболочки [100, 102, 103]. Недавние, биофизические и биохимические исследования подтвердили, что HBD-2 связывается с рецептором вируса SARS CoV-2 (а именно с RBD), а также предотвращает его дальнейшее связывание с ангиотензин превращающим ферментом 2 [101].

Суммируя вышесказанное, врожденный иммунитет представляет собой первую линию защиты, активирующуюся немедленно после контакта с патогеном. На слизистых оболочках дыхательных путей находятся различные клетки, такие как макрофаги, дендритные клетки и др., которые обеспечивают быстрый ответ на инфекционный агент. Эти клетки распознают вирусные частицы и инициируют сигнальный каскад реакций ведущий к выработке цитокинов и хемокинов, что

способствует привлечению других иммунных клеток к месту инфекции и производству АМП.

Однако, для формирования стойкого иммунитета необходима активация адаптивного иммунитета. Один из компонентов адаптивного иммунитета является клеточный иммунитет. В частности, после первоначального контакта с SARS-CoV-2, дендритные клетки, представляющие вирусные антигены, мигрируют в лимфатические узлы, где активируют Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Активированные Т-лимфоциты выделяют цитокины, которые регулируют иммунный ответ. Цитотоксические Т-лимфоциты проникают в пораженные ткани и индуцируют апоптоз инфицированных клеток. Это приводит к формированию специфического иммунного ответа, который позволяет организму запоминать вирус и обеспечивать реакцию в случае повторной инфекции.

### **1.3. Механизмы адаптивного иммунитета**

В отличие от врожденного, адаптивный иммунитет проявляет исключительную специфичность в распознавании целевых антигенов, благодаря антигенспецифическим рецепторам, экспрессируемым на поверхностях Т- и В-лимфоцитов. При заболевании COVID-19 реакции адаптивного иммунитета являются важной частью иммунного ответа организма на вирус SARS-CoV-2. При наличии в организме вируса SARS-CoV-2 первыми вырабатываются IgM. Уровень продукции этих иммуноглобулинов может повышаться в течение первых нескольких недель после инфицирования вирусом. Дальнейшая гуморальная защита в ответ на вирус обеспечивается IgG, который вырабатывается спустя 3 недели после инфицирования. Данные антитела (IgG) обеспечивают долгосрочную защиту, нейтрализуя вирус и обеспечивая формирование иммунной памяти об инфекции для более быстрого ответа при повторном заражении.

Однако, гуморальная защита на уровне слизистых оболочек обеспечивается антителами, которые в человеческих выделениях (например, слезы, слюна, молоко, кишечная жидкость) относятся преимущественно к изотипу IgA (Рисунок 13). Эти

антитела локально продуцируются обильными плазматическими клетками, которые проникают в субэпителиальные пространства. Люминальный эпителий постоянно подвергается воздействию экзогенных антигенов, которые поглощаются субэпителиальными антигенпрезентирующими клетками (АПК). Эти АПК процессируют антигены и индуцируют иммунные реакции слизистой оболочки в местных лимфоэпителиальных структурах. Как правило, активированные АПК Т-клетки в системе MALT праймируют наивные В-клетки. В ответ на эту активацию В-клетки в фолликулах подвергаются соматической гипермутации, приводящей к развитию клеток памяти и выработке антигенспецифических антител, среди которых важнейшим является IgA [104].

Критическими компонентами сети иммунитета слизистой оболочки, играющими ключевую роль в борьбе с SARS-CoV-2, является секреторный IgA (s-IgA), и тканерезидентные Т- и В-клетки памяти ( $T_{RM}$ ), компоненты местного адаптивного иммунитета, а также инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), система комплемента слизистой оболочки и интерфероны слизистой оболочки (IFNs) как компоненты местного врожденного иммунитета [6].

Исследования иммунных реакций в кровотоке и во внешних секретах, включая как антитела, так и задействованные клетки, показывают, что системный и слизистый отделы иммунной системы различны и в значительной степени независимы. Реакции антител, индуцированные в секрете, совершенно отличаются от реакций в плазме в отношении их соответствующего происхождения, уровней, изотипов, специфичности и функций. Плазменный IgA присутствует почти исключительно в мономерной форме с выраженным доминированием подкласса IgA1 и продуцируется преимущественно в костном мозге, тогда как IgA слизистой оболочки продуцируется в полимерной форме (в основном димеры и тетрамеры) многочисленными плазменными клетками, лежащими под эпителием [105]. Эпителиальные клетки экспрессируют полимерный рецептор Ig (pIgR), который транспортирует локально синтезированный, содержащий J-цепь, полимерный (p) IgA через эпителий во внешний секрет и протеолитически расщепляется вовремя

транскитоза с высвобождением секреторного компонента sIgA. Инфекция SARS-CoV-2 индуцирует повышение секреторного иммуноглобулина класса А в слизистой оболочке (например, в слюне или мазках из носа), а также системные реакции антител IgG [104]. При этом наибольший рост наблюдается для IgA слизистой оболочки, системного IgA, а также периферических плазмобластов IgA в слизистой оболочке. Нейтрализующая активность SARS-CoV-2 полимеров иммуноглобулина А, первичной формы антител (димеров и тетрамеров) в носоглотке, оказалась в среднем в 15 раз и в  $\approx 7$  раз более эффективной, чем мономерного IgA и плазменного IgG соответственно [106]. Интересно, что заболевшие пациенты с симптомами со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) демонстрируют лучший клинический результат со значительно более низким уровнем смертности, чем пациенты без симптомов со стороны ЖКТ [107]. Частицы и мРНК SARS-CoV-2 можно обнаружить в биоптатах слизистых оболочек отдаленных локализаций от пациентов даже через 3 месяца с начала заболевания, несмотря на отсутствие мРНК SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки [107]. Таким образом, кишечные вирусные пулы SARS-CoV-2 могут стимулировать устойчивую выработку нейтрализующих антител sIgA слизистой оболочки в компартментах MALT, включая дыхательные пути, особенно за счет двусторонней иммунной взаимосвязи оси кишечник – легкие.



иммунитет, возникающий позже, играет критическую роль в формировании специфических защитных реакций, включая образование нейтрализующих антител, которые связываясь с вирусом, предотвращают его дальнейшее распространение.

Следовательно, эффективная защита слизистых оболочек верхних дыхательных путей при COVID-19 зависит от сбалансированной работы как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Понимание взаимодействий между врожденным и адаптивным иммунитетом слизистых оболочек ВДП при заболевании COVID-19 имеет важное значение для представления о молекулярных механизмах иммунной системы слизистой оболочки.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

В соответствии с поставленными задачами в период с осени 2020 года до июня 2021 года осуществлялся забор материала для исследования.

На клинической базе Главного военного клинического госпиталя войск национальной гвардии Российской Федерации (главный врач полковник медицинской службы Багаев О.Я.) было отобрано 36 пациентов, среди которых женщин (n=16), мужчин (n=20), с заболеванием COVID-19 протекающим в среднетяжелой форме. Забор биологического материала осуществлялся на 1-е, 15-е, 30-е сутки с момента заболевания.

На кафедре госпитальной терапии ПФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова (заведующий кафедрой, госпитальной терапии ПФ академик РАН д.м.н., профессор Чучалин А.Г.) на клинической базе ГКБ 57 имени Д. Д. Плетнева было отобрано 25 пациентов, перенесших заболевание COVID-19. Забор материала осуществляли на 4 месяц, 6 месяц, 8 месяц после инфекции COVID-19.

Контрольную группу составили пациенты (n=30) в возрасте 18-60 лет без сопутствующей патологии, протекающей беременности и иных хронически/острых заболеваний различной этиологии, а так же пациенты у которых на момент забора материала были отрицательные тесты (ПЦР-РВ и ИФА) на наличие вируса/антител к вирусу SARS-CoV-2. Забор материала у представителей контрольной группы проводился в КДЦ ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова».

#### 2.1.1. Характеристика клинических групп

С целью отбора пациентов для данного исследования в каждую из групп использовались специальные характеристики исследуемых групп – критерии включения и исключения (Таблица 1).

Критериями включения в группу лиц со среднетяжелым заболеванием COVID-19 являлись: пациенты с подтвержденным анализом ПЦР на COVID-19 находящиеся на стационарном/амбулаторном лечении с явными клиническими проявлениями пневмонии.

Критерием включения в группу лиц, перенесших заболевание COVID-19, являлись: лица, перенесшие заболевание COVID-19 с постановкой диагноза «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19» (вирус был подтвержден лабораторным тестированием). Вирус не идентифицирован в последних двух лабораторных исследованиях

Критериями исключения из настоящего исследования являлись пациенты младше 18 лет с протекающими сопутствующими заболеваниями бронхолегочного аппарата, с хронически протекающими заболеваниями, наличие онкологических и/или аутоиммунных заболеваний, требующих постоянного приема препаратов, а также пациенты с хроническими вирусными инфекциями и пациенты с подтвержденной на момент забора материала беременностью.

В установленном порядке пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных. В соответствии с требованиями к диссертационной работе был пройден локальный этический комитет. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова» (Протокол ЛЭК от 26.11.2020 года).

У всех пациентов осуществлялся забор эпителиальных клеток со слизистых оболочек верхних дыхательных путей: носоглотка, ротоглотка, ротовая полость (внутренняя поверхность щеки), а также сыворотку крови.

Каждый образец был промаркирован на самой пробирке (сбоку) и на конверте с образцом. Забор производился эпителиальных клеток осуществляли цитощеточкой типа А (Юнона, РФ) и транспортировали в лабораторию в пробирке на 1,5 мл (Eppendorf, Германия) в физиологическом растворе (Панеко, РФ) и хранили при температуре минус 80 °С.

Забор образцов сывороток в объеме 2 мл осуществлялся в пробирки с гелем и активатором свертывания (Vacuette, Greiner Bio-One, Австрия). Пробирки

с сыворотками центрифугировали 10 мин при 2500 g после чего сыворотки переливали в пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия) и хранили при температуре минус 80 °С. Транспортировку биологических образцов осуществляли с соблюдением холодной цепи.

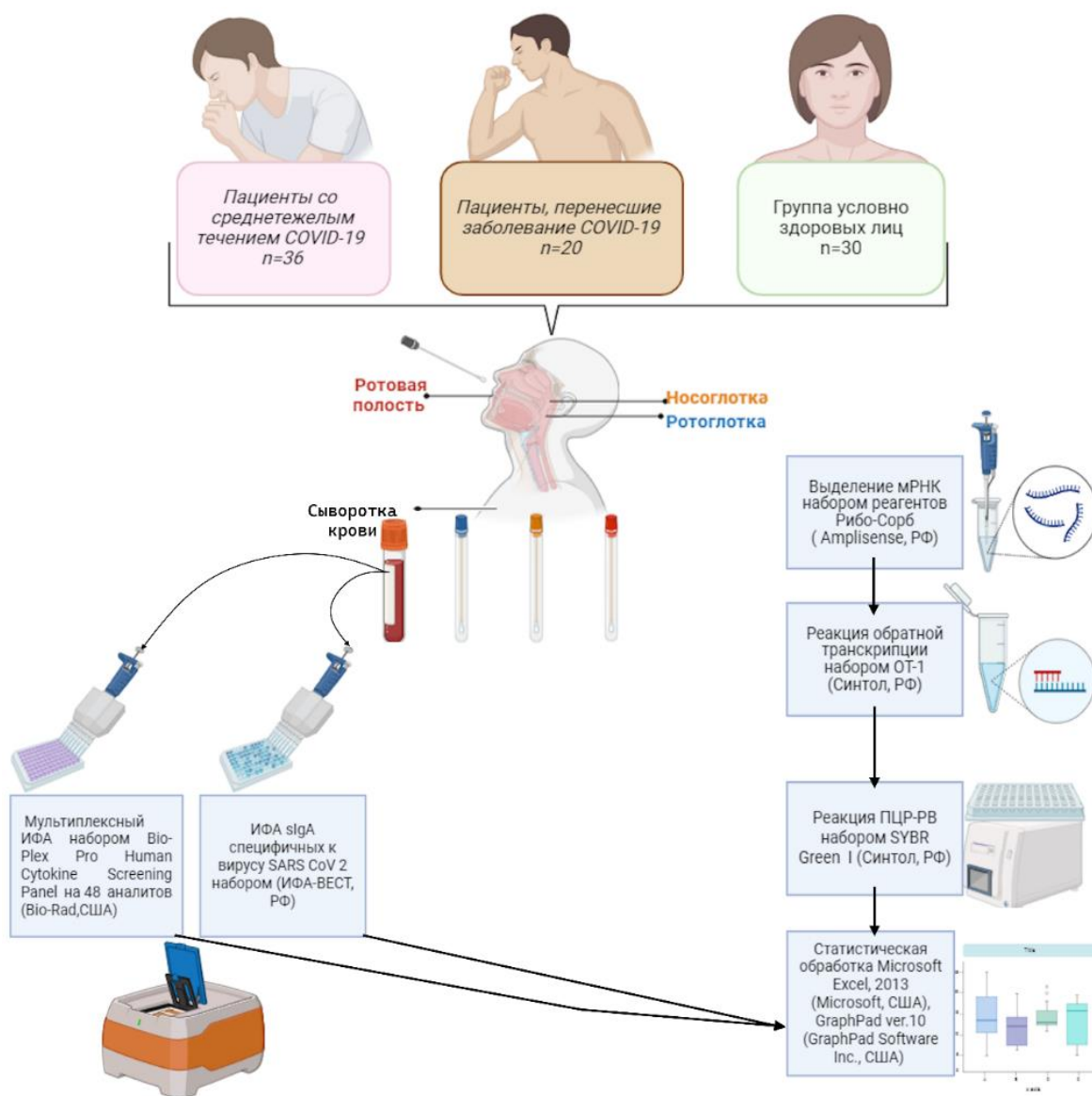


Рисунок 14 – Общая схема исследования

Рисунок 14 демонстрирует общую схему исследования определения факторов врожденного и адаптивного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей.

Таблица 1 – Характеристика клинических групп, критерии включения и исключения в основную и контрольную группу

Группа	Критерии включения	Критерии исключения для групп	Общие критерии исключения
<p><i>Пациенты со среднетяжелым течением COVID-19</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Возраст пациентов 20-50 лет;</li> <li>• наличие, двух и более из нижеперечисленных клинических признаков: острая лихорадка в начале заболевания (температура <math>\geq 38,0^{\circ}\text{C}</math>), кашель с мокротой, физические признаки пневмонии (фокус крепитации и/или мелкопузырчатых хрипов, жесткое бронхиальное дыхание, укорочение перкуторного звука), лейкоцитоз <math>&gt; 10 \times 10^9/\text{л}</math> и/или палочкоядерный сдвиг <math>&gt; 10\%</math>;</li> <li>• наличие КТ-признаков поражения легочной ткани 25-50% (феномен «матового стекла» 2 степени, ретенционные и тракционные бронхоэктазы)</li> <li>• рентгенологически подтвержденной инфильтрации легочной ткани</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Лица моложе 18 лет и старше 65 лет</li> <li>• Пациенты с бессимптомным и легким течением заболевания COVID-19</li> <li>• Пациенты с поражением легких менее 25% и не более 50%</li> <li>• Пациенты, находящиеся в ОРИТ и нуждающиеся в ИВЛ аппарате.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Сопутствующие заболевания (легочные: муковисцидоз, абсцесс легких, эмпиема плевры, активный туберкулез; внелегочные: застойная сердечная недостаточность, синдром мальабсорбции, хроническая/острая печеночная недостаточность, острая почечная недостаточность, хроническая болезнь почек (с указанием стадии) цирроз печени, злокачественные образования, иммунодефицит различной этиологии;</li> <li>• Наличие в анамнезе положительной реакции на ВИЧ-инфекцию, гепатита В и С;</li> <li>• Длительное применение (более 14 дней) иммунодепрессантов или других иммуномодулирующих препаратов в течение шести месяцев, предшествующих исследованию;</li> <li>• Любое подтвержденное или предполагаемое иммуносупрессивное, иммунодефицитное или аутоиммунное заболевание;</li> <li>• В анамнезе хроническое злоупотребление алкоголем и/или употребление наркотиков;</li> <li>• Выраженные врожденные дефекты или серьезные хронические заболевания (в том числе и в стадии обострения), включая любые клинически значимые заболевания легких, почек, сердечно-сосудистой, нервной системы, психиатрических заболеваний или метаболических нарушений, подтвержденных данными анамнеза или объективным обследованием;</li> </ul>

## Продолжение Таблицы 1

<i>Группа</i>	<i>Критерии включения</i>	<i>Критерии исключения для групп</i>	<i>Общие критерии исключения</i>
<i>Пациенты, перенесшие заболевание COVID-19</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Возраст пациентов 20-50 лет.</li> <li>• лица, перенесшие заболевание COVID-19 с постановкой диагноза «Коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19» (вирус был подтвержден лабораторным тестированием) вирус не идентифицирован в последних двух лабораторных исследованиях</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Лица моложе 18 лет и старше 65 лет</li> <li>• Лица без перенесенного заболевания COVID19</li> <li>• Наличие на момент забора положительного ПЦР теста на идентификацию вируса SARS-Co-V2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Наличие иных (подтвержденных лабораторными методами исследования) острых инфекционных и/или неинфекционных заболеваний на момент включения в исследование;</li> <li>• Протекающая беременность и/или лактация;</li> </ul>
<i>Контрольная группа</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Здоровые лица (18-60 лет) без сопутствующей патологии, протекающей беременности и иных хронически/острых заболеваний различной этиологии.</li> <li>• Наличие двух отрицательных тестов (ПЦР и ИФА) на наличие вируса/антител COVID-19 (для исключения ложноотрицательного</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Лица моложе 18 лет и старше 65 лет</li> <li>• Наличие на момент забора положительного ПЦР теста на идентификацию вируса SARS-CoV-2</li> <li>• Наличие на момент забора антител к вирусу SARS-CoV-2</li> </ul>	

### *Взятие биоматериала*

Мазок из полости носа для настоящего исследования забирали сухими стерильными ватным тампоном (зонд ортологический типа А (Юнона, РФ)). Перед взятием материала полость носа очистили от слизи, лейкоцитов, слущенных клеток эпителия. Тампон вводился легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускали книзу, вводили в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, проводили вращательное движение и удаляли вдоль наружной стенки носа. Мазок барался из обеих полостей носа.

Мазок из полости рта для настоящего исследования забирали с помощью зонда ортологического типа А (Юнона, РФ). Забор материала осуществлялся натощак или не ранее, чем через 2 часа после еды. Зонд вводился в полость рта, не касаясь зубов, языка, слизистой оболочки щек, твёрдого и мягкого неба. Легким вращательным движением проворачивали тампон по задней стенке глотки. Проводили тампоном по небным дужкам и миндалинам в следующей последовательности: правая небная дужка, правая миндалина, язычок, левая небная дужка, левая миндалина. Далее зонд извлекался из ротовой полости, не касаясь слизистой оболочки рта, зубов, языка.

Для получения клеток букальной области перед взятием материала удаляли остатки слюны, помещая ее в отдельную пробирку на 1,5 мкл. И обрабатывали ротовую полость стерильным физиологическим раствором (Панеко, РФ).

Все тампоны погружали в стерильные пробирки с 500 мкл физраствора (Панеко, РФ), отламывали концы палочек и плотно закрывали. Материал в течение 1 – 3 часов доставлялся в лабораторию в специальном контейнере с охлаждающими элементами при температуре минус 6°С. Материал хранили при температуре минус 80 °С.

Все пациенты за 2-3 дня до забора воздерживались от приема антибиотических препаратов, противовирусных препаратов, за сутки до забора исключали использование назальных кортикостероидов, назальных спреев и капель, оральных контрацептивов, оральных лекарственных средств, а также БАДов.

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Выделение нуклеиновых кислот

Из клеток слизистого эпителия верхних дыхательных путей выделяли общую РНК методом сорбции с помощью коммерческого набора «РИБО-сорб» (Amplisense, Россия) в соответствии с протоколом проведения для данного набора. Для этого пробирку на 1,5 мл в количестве 100 мкл, добавили 300 мкл лизирующего буфера. Далее пробирки ресуспензировали в центрифуге типа Vortex (Minispin, Германия) и добавляли 25 мкл сорбента. После чего пробы ресуспензировали и отстаивались в течении 1 и 5 минут. После чего была удалена надосадочная жидкостью с целью проведения серии отмывок «Растворами для отмывки 1,3,4». «Раствором отмывки 1» в количестве 400 мкл добавляли в пробирку с образцом, тщательно ресуспензировали дозатором в течении 30 секунд и удаляли надосадочную жидкость. «Раствором для отмывки 3» в количестве 500 мкл на пробу отмывали дважды в соответствии с протоколом для данного набора. Далее использовали «Раствор для отмывки 4» в количестве 400 мкл и ресуспензировали. После чего удалялась надосадочная жидкость и пробирки с открытыми крышками были погружены в термостат «Термит» (ДНК технология, РФ) при температуре 65 °С на 15 минут для высыхания. После чего, в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл РНК- буфера с последующим ресуспензированием и далее инкубировали в течении трех минут в термостате «Термит» (ДНК-Технология, РФ) при температуре 60 °С. Далее надосадочная жидкость удалялась в отдельные пробирки и обрабатывалась ДНКазой (Синтол, РФ) и хранилась при температуре минус 70 °С для последующего проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР анализа. Проверка качества выделенной РНК осуществлялась с помощью спектрофотометра типа Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, США). Этот прибор предназначен для определения спектров поглощения образцов в малых объемах (0,5- 2 мкл) в широком диапазоне длинны волны (190 -840 нм).

РНК, при должном уровне очистки, соотношение поглощения на длинах волн 260/280 нм ( $A_{260/280}$ ) составляет примерно 1,9-2. В ходе измерения экспериментальных образцов  $A_{260/280} = 1,7 \pm 0,3$ . Полученная РНК хранилась при температуре минус 70 °С для дальнейшей постановки реакции обратной транскрипции.

### 2.2.2. Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили для синтеза на матрице мРНК кДНК для последующего проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью «Набора для обратной транскрипции -1» (Синтол, РФ) в пробирке на 1,5 мкл (Eppendorf, Германия) готовили смесь двух праймеров: 1 мкл OligoDT15, который комплиментарен поли(А)- концу зрелых мРНК, который используется для лучшего изучения 3' конца РНК и 1 мкл универсального праймера Random-6 (случайная последовательность шестичленных олигонуклеотидов) и 8 мкл очищенной деионизированной воды (MQ) на 1 пробу. Смесь раскапывали по пробиркам по 8 мкл на 1 пробу. Далее добавляли по 5 мкл РНК (концентрация в диапазоне 0,18-0,2 мгк /мкл). В отдельной пробирке при готовили реакционную смесь: MMLV-RT-1мкл ;2,5X Реакционная смесь – 10 мкл.

Пробирки с пробами и праймерами инкубировали в термостате при температуре 75 °С («Термит», ДНК технология, РФ) в течении 3 минут, а затем инкубировали в холодильнике до +4 °С в течении 3 минут, после чего добавляли по 13 мкл реакционной смеси. Далее пробирки инкубировались в термостате на 37 °С в течении часа и потом переносились в амплификатор при 95 °С на 5 минут.

Полученная кДНК хранилась при температуре минус 70 °С для дальнейшей постановки реакции ПЦР-РВ.

### 2.2.3. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

В своей работе мы использовали модификацию метода ПЦР, называемую ПЦР реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I.

Последовательность праймеров для генов *TLR3*, *TLR7*, *IL1 $\beta$* , *IL 18*, *IL 28*, *TNF- $\alpha$* , подбирали с помощью программы Vector NTI ver.10 (Thermo Fisher Scientific Inc., США), анализируя последовательность интересующих генов, полученную из GenBank (Таблица 2).

Таблица 2 – Специфичные последовательности праймеров (F – прямые, R – обратные)

Ген	Прям./обрат.	Последовательность праймера	Температура отжига практическая, T°C
<i>TLR3</i>	F	TCG-AGA-GTG-CCG-TCT-ATT-TGC-C	62
	R	CTT-GGT-GGT-GGA-GGA -TGC-ACA	
<i>TLR7</i>	F	TCA-AGC-TGA-TCT-TGG-CAC-CTC-T	
	R	GAG-TGA-CAT-CAC -AGG-GCA-GAG-T	
<i>IL28B</i>	F	TGA-AGG-ACT-GCA-AGT-GCC-GC	
	R	GGG-CTG-GGT-CAG-TGT-CAG-C	
<i>IL1<math>\beta</math></i>	F	TCG-AGG-CAC-AAG-GCA-CAA-CA	
	R	TCA-CTG-GCG-AGC-TCA-GGT-ACT	
<i>ACT</i>	F	GCG-GGA-AAT-CGT-GCG-TGA-CAT-T	
	R	GAT-GGA-GTT-GAA-GGT-A -TTC-GTG	
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F	TCT-CGG-TTT-CTT-CTC-CAT-CG	
	R	ATA-GGT-TTT-GAG-GGG-CAT-GG	

Все полученные последовательности проверяли на отсутствие димеров и шпилек. Подборка оптимальных температур отжига праймеров осуществлялась с использованием формул  $T_m(^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$  и программ Primer\_Analysis. Эффективность праймеров проверяли с помощью построения стандартной кривой

и коэффициента детерминации. Эффективность анализа определяется наклоном линии, рассчитываемым по формуле: **Эффективность =  $[10^{(-1 / \text{наклон})}] - 1 * 100\%$** . Оптимальными значениями эффективности праймеров и анализа является 90-110%. Эффективность подобранных праймеров оценивалась в  $95 \pm 3\%$ . Для контроля использовались две пробы: отрицательный контроль ПЦР (К-): реакционная смесь+ вода и отрицательный контроль обратной транскрипции (РТК-). Для оценки порогового значения и чистоты экспериментов контрольные образцы раскапывали следующим образом: 3 контроля (2 из которых ОКО ПЦР анализа и 1(РТК-)) в первых нескольких лунках планшета и закрывали эти лунки перед добавлением образцы в любую из других лунок. Затем готовили 3 лунки контроля (2 из которых ОКО ПЦР анализа и 1(РТК-)) после раскапывания всех образцов.

Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Реакционная смесь в ПЦР пробирки 0,5 мл (Deltalab, Испания) содержала 1,5 мкл 10x ПЦР-буфера Б, 1 мкл каждого праймера (20 пкмоль/мкл), 1,5 мкл  $MgCl_2$  (25 мМ), 1,5 мкл dNTP (2,5 мМ), 0,5 мкл SynTaq ДНК-полимеразы (5 Е/мкл), 5,5 мкл деионизированной воды и 5 мкл проб кДНК, полученных с помощью реакции обратной транскрипции, а в пробирку отрицательного контроля добавляли 5 мкл деионизированной воды (Синтол, РФ). Далее пробирки помещали в прибор ДТPrime 5/ДТ-96 (ДНК-технология, РФ).

Стандартизация результатов ПЦР-РВ проводилась по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства»  $\beta$ -актина. Анализ экспрессии генов проводили с использованием метода метода  $2^{-\Delta\Delta C(t)}$  [108].

#### **2.2.4. Иммуноферментный анализ**

Для определения уровня sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 в исследуемом биологическом материале, а использовался модифицированный набор иммуноферментного определения человеческих sIgA (ИФА-ВЕСТ, РФ).

Процедура анализа проводилась в соответствии с модифицированной инструкцией от производителя.

Приготавливали серию разведений стандартов sIgA согласно инструкции от производителя. Диапазон разведения стандартов соответствовал концентрациям от 1-20 мг/л (для sIgA). Далее в соответствующие лунки вносили по 100 мкл стандартов и образцов. Плашку закрывали плотно прилегающей адгезивной пленкой и осторожным постукиванием удаляли пузырьки воздуха. Далее планшет инкубировался в течении 25 минут при температуре 37 °С в термостате. После чего удаляли пленку, опустошали планшет и просушивали постукиванием о фильтровальную бумагу для проведения серии отмывок. В лунки добавляли по 350 мкл промывочного буфера на 30 секунд с последующим опустошением планшета. Процедура отмывки повторяли 5 раз. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл антитела, соблюдая последовательность как при введении образцов и стандартов, не касаясь дна лунок. Плашку снова закрывали непроницаемой адгезивной пленкой и инкубировали при 37 °С в термостате в течении 30 минут. Далее планшет опустошали с целью проведения серии отмывок. Вносили по 100 мкл разведенного конъюгата в каждую лунку. Закрывали пленкой и инкубировали 25 минут в термостате. Далее после инкубации планшет опустошали и 5 раз промывали промывочным раствором с последующим промачиванием о фильтровальную бумагу для удаления капель. Вносили по 100 мкл раствора субстрата пероксидазы в каждую лунку, закрывали адгезивной пленкой и ставили на 20 минут на инкубацию в защищенном от света месте. Далее проводили остановку реакции внесением по 100 мкл стоп-реагента и измеряли оптическую плотность в диапазоне длинны волны от 450 нм - 460 нм с помощью иммуноферментного анализатора (Пикон, РФ).

### **2.2.5. Мультиплексный иммуноферментный анализ**

Определение уровня цитокинов в сыворотке крови, а также в соскобах с ротоглотки проводили с использованием флуоресцентного ридера MAGPIX

(Bio-Rad, США). Для измерения использовался набор реактивов Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel на 48 аналитов (Bio-Rad, США) (Таблица 3). Процедура анализа проводилась в соответствии с инструкцией от производителя.

Таблица 3 – Аналиты, определяемые в одном образце в ходе мультиплексного ИФА

FGF basic	Exotaxin	G-CSF	GM-CSF	IFN- $\gamma$	IL-1 $\beta$	IL-1ra	IL-1 $\alpha$	IL-2R $\alpha$	IL-3
IL-12 (p40)	IL-16	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-9	GRO- $\alpha$
HGF	IFN- $\alpha$ 2	LIF	MCP-3	IL-10	IL-12 (p70)	IL-13	IL-15	IL-17A	IP-10
MCP-1 (MCAF)	MIG	$\beta$ -NGF	SCF	SCGF- $\beta$	SDF-1 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	PDGF-BB	RANTES
TNF- $\alpha$	VEGF	CTACK	MIF	TRAIL	IL-18	M-CSF	TNF- $\beta$		

Полученные концентрации [пг/мл] далее подвергались статистическому анализу.

### 2.2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическая достоверность между двумя группами данных была рассчитана при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Непараметрический критерий Манна-Уитни является стандартным критерием для сравнения значений двух независимых выборок. Для каждого ряда данных в зависимости от группы, типа биологического материала, периода забора биологического материала были посчитаны медианные значения. На основании этих данных были построены графики медианных значений. Информация представлена с помощью диаграмм размаха (Box-plot graphs), что позволяет визуально интерпретировать группы через квартили. Диаграмма «Box» отображает квартили Q1 и Q3, а линия между ними указывает на медиану; «планки»

демонстрируют уровень разброса данных. Данные обеих групп объединяли и упорядочивали по возрастанию. Каждому значению приписывали ранг. Для меньшей группы вычисляли сумму рангов( $T$ ). Полученное значение  $T$  сравнивали с критическими значениями из таблицы критических значений. Если  $T$  меньше или равно первому из них или больше или равно второму, то выборки считались достоверными [109].

В случае сравнения трех и более групп данных использовали непараметрический  $H$  критерий Краскела-Уоллиса. Этот критерий является обобщением критерия Манна-Уитни, который предназначен для сравнения нескольких групп. Все данные, полученные в ходе данного исследования, объединяли, упорядочивали по возрастанию и ранжировали для определения  $U$  критерия достоверности. Каждое значение получало свой ранг. Далее производился подсчет суммы рангов по группам и среднее значение рангов в выборках [109].

Корреляционную зависимость для непараметрических ранговых величин оценивали с использованием метода Спирмена [109].

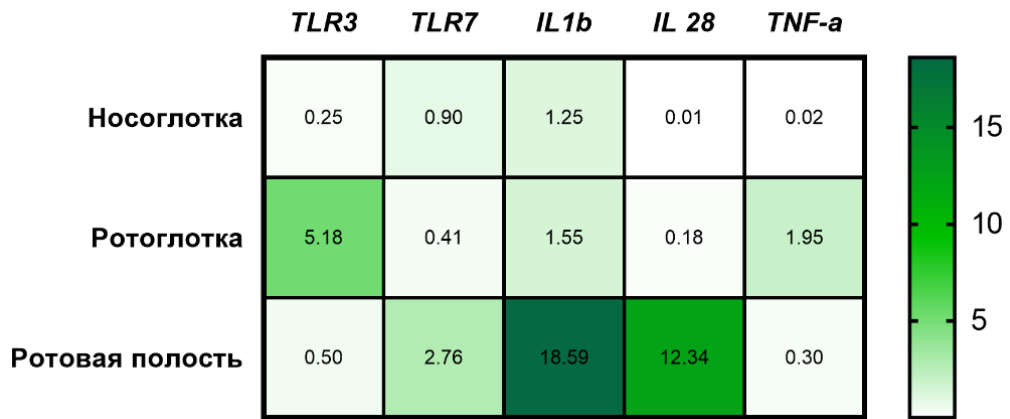
Для оценки данных, полученных в ходе мультиплексного ИФА, использовали метод множественного сравнения. Данный метод позволяет провести на одной и той же выборке множественное сравнение таким образом, чтоб вероятность хотя бы одного заключения оставалась на выбранном уровне значимости 5 %. Для этого использовали метод Холм-Сidak как более мощную модификацию метода Бонферрони [109].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программных обеспечений Microsoft Excel, 2019 (Microsoft, США), GraphPad ver.10 (GraphPad Software Inc., США).

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### **3.1. Анализ экспрессионного профиля рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей в группе условно здоровых лиц**

Поскольку, вирус SARS-CoV-2 преимущественно поражает слизистую верхних дыхательных путей именно на уровне слизистых оболочек происходит распознавание вирусных частиц, по принципу «свой-чужой» и запускаются механизмы врожденного иммунитета, который обеспечивает быстрое реагирования на различные патогены и способствуют предотвращению развития инфекции [46]. Результатом данного распознавания является запуск внутриклеточной сигнализации, приводящий к активации защитных механизмов, в частности, таких как продукция цитокинов (например, интерферонов 1 типа) или защитных пептидов – дефензинов. Поскольку известно, что заболевание COVID-19 инфицирует слизистые оболочки верхних дыхательных путей, то становится очевидным, что механизмы мукозального иммунитета необходимы для защиты от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Для предотвращения вирусной инфекции в организме существует несколько уровней защиты, одним из которых выступают механизмы врожденного иммунитета слизистой оболочки верхних дыхательных путей [110, 111]. Клетки слизистой оболочки способны не только распознавать консервативные структуры на поверхности вируса через мембраносвязанные и внутриклеточные рецепторы, но и запускать различные сигнальные каскады, способствующие элиминации вирусных частиц [112]. Поскольку в нашей работе мы исследовали иммунологические факторы при различных состояниях связанных с короновирусной инфекцией, то было необходимо сначала оценить экспрессию этих факторов в группе условно здоровых лиц. В работе были получены следующие результаты (Рисунок 15).



Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше связь, тем насыщеннее градиент цвета

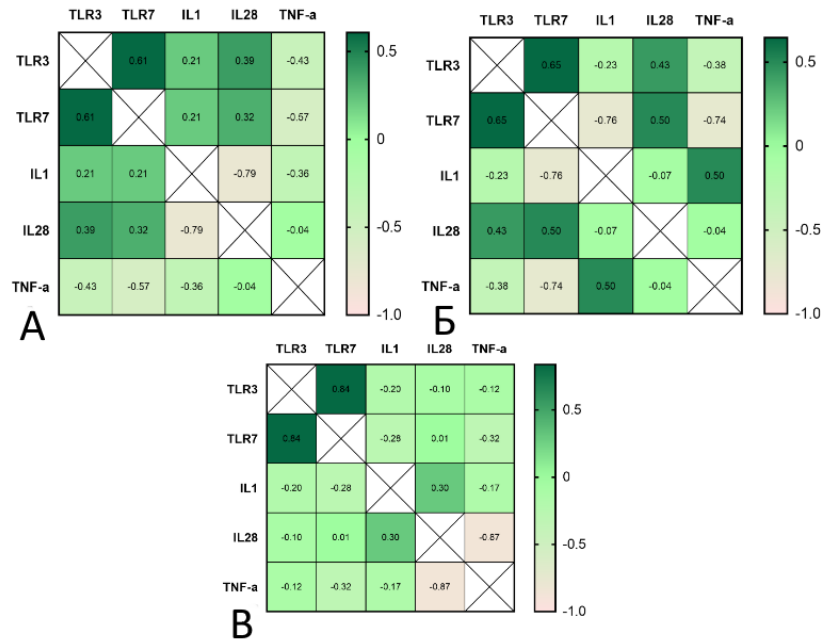
Рисунок 15 – Уровень экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета у условно здоровых лиц

Относительно слизистых оболочек ротоглотки и ротовой полости на уровне носоглотки наблюдался сниженный уровень экспрессии рецепторных и эффекторных молекул иммунной системы в группе условно здоровых лиц (Рисунок 15). В то время как, на уровне слизистых оболочек ротоглотки было выявлено увеличение уровня экспрессии генов *TLR3*, *TNF- $\alpha$*  у группы условно здоровых лиц. На уровне слизистых оболочек ротовой полости было выявлено увеличение уровня экспрессии *TLR7*, *IL1 $\beta$* , *IL28* относительно слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки (Рисунок 15). Такое увеличение уровня экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне ротовой полости и ротоглотки относительно слизистых оболочек носоглотки можно объяснить тем фактом что микробиота ротоглотки и ротовой полости может стимулировать базальный уровень экспрессии этих молекул для поддержания гомеостаза и защиты от патогенов [113, 114]. Микробиом ротоглотки и ротовой полости содержит в себе более разнообразное бактериальное окружение в сравнении с микробиомом носоглотки [115, 116].

Таким образом, выявлена разнонаправленная экспрессия рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП в группе условно здоровых лиц. Полученные данные согласуются с научной литературой [113, 116, 117]. Действительно, разнонаправленный уровень

экспрессии молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей может быть обусловлен множеством факторов, включая воздействие патогенов, состояние здоровья слизистых оболочек, а также гистологическими особенностями строения эпителиальных клеток ВДП [118, 119, 120]. Так, например, строение слизистого эпителия носоглотки и части ротоглотки гистологически представлено многоядерным призматическим реснитчатым эпителием [121]. При наличии здорового и функционирующего многоядерного реснитчатого эпителия может наблюдаться снижение уровня экспрессии молекул врожденного иммунитета (таких как TLRs и некоторые цитокины) [115, 120]. Это связано с тем, что барьерная функция эпителия достаточно эффективна для предотвращения проникновения патогенов [122]. Ко всему прочему, факторы окружающей среды, такие как загрязнение воздуха, курение, стресс и другие могут влиять на экспрессию молекул врожденного иммунитета на уровне эпителиальных клеток дыхательных путей [115, 120].

При исследовании взаимосвязи между экспрессией рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета проводили корреляционный анализ этих факторов на уровне слизистых оболочек ВДП. Данные по корреляционному анализу в группе условно здоровых лиц выявили наличие сильной взаимосвязи между генами *TLR3* и *TLR7* на уровне слизистых оболочек ВДП (Рисунок 16). При этом, на уровне слизистых оболочек ротовой полости описанная взаимосвязь была статистически значима ( $r=0,84$   $p= 0,00710$ ). Хотя *TLR3* и *TLR7* используют разные адаптерные белки (TRIF и MyD88 соответственно), они оба могут активировать транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B и IRF), ведущие к продукции интерферонов и других цитокинов. Таким образом, активация одного типа рецептора может косвенно влиять на экспрессию и активацию другого через общие сигнальные каскады и перекрестные связи [46]. Оба рецептора могут усиливать экспрессию и функциональную активность друг друга через общие сигнальные пути и индукцию интерферонов и других цитокинов [122]. Перекрестная активация этих рецепторов помогает клеткам более эффективно реагировать патогены и запускать адекватный иммунный ответ [122, 123].



Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше связь, тем насыщеннее градиент цвета

Рисунок 16 – Сила взаимосвязи между переменными (значения экспрессии  $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ) на уровне слизистых оболочек носоглотки (А), ротоглотки (Б), ротовой полости (В) определялась с помощью коэффициента корреляции r-Спирмена ( $p < 0,05$ )

Изучение экспрессионного профиля молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП в группе условно здоровых лиц дает понимание об относительном уровне экспрессии различных молекул, таких как Toll-подобные рецепторы (TLRs), цитокины (например,  $IL-1\beta$ , IFNs), и других компонентов иммунной системы в зависимости от локализации и гистологических особенностей.

Полученные данные позволяют лучше понять изменения иммунитета, происходящие у пациентов с COVID-19, различной степени тяжести. Сравнение профилей экспрессии генов у здоровых и пациентов с новой коронавирусной инфекцией, протекающей в среднетяжелой степени тяжести может указать на то, какие молекулы могут играть ключевую роль в патогенезе заболевания.

### **3.2. Экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц со среднетяжелым течением COVID-19**

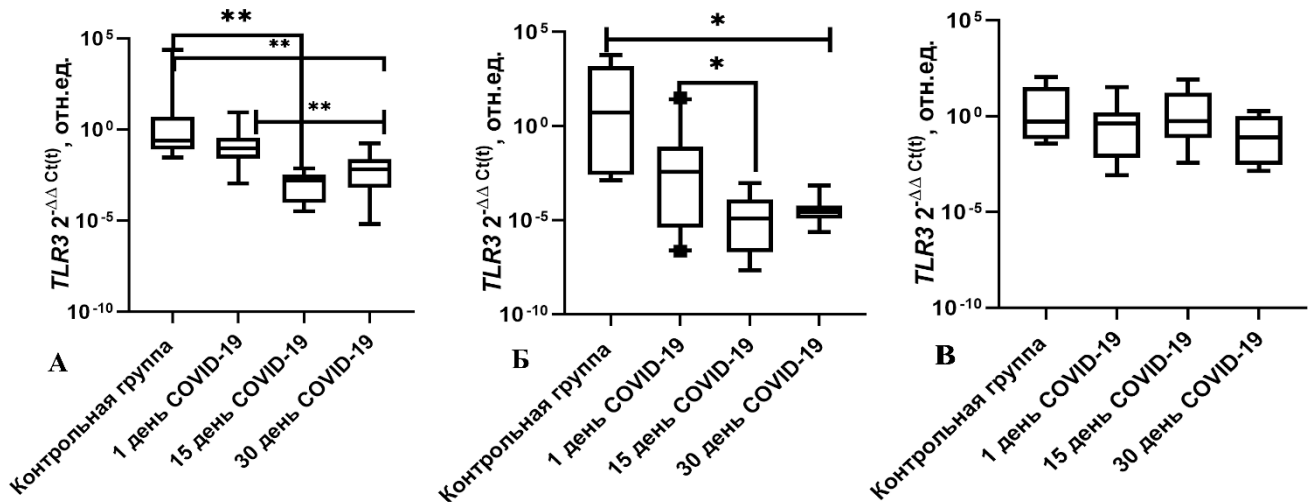
Поскольку вирус SARS-CoV-2 осуществляет репликацию в цитоплазме эпителиальных клеток дыхательных путей, что в дальнейшем приводит к инфицированию клеток легочной ткани, реакции врожденной иммунной системы в эпителиальных клетках дыхательных путей играют решающую роль в инфекции COVID-19. Известно, что тяжесть протекания данного заболевания напрямую зависит от иммунного ответа. Клиническая картина тяжелого течения заболевания COVID-19 характеризуется неэффективной гипервоспалительной реакцией с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов. Такая гипервоспалительная реакция в ответ на действие вируса SARS-CoV-2 является результатом активации врожденного иммунитета, который формирует иммунный ответ и является первой линией защиты от патогенов.

#### ***Рецепторный аппарат врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при среднетяжелом течении COVID-19***

Известно, что многие рецепторные молекулы участвуют в противовирусном иммунном ответе. Так, например, TLR3 участвует в распознавании многих вирусов, в том числе и возбудителей респираторных заболеваний. TLR7 так же участвует в распознавании вирусного генома SARS-CoV-2. Высокий уровень экспрессии TLR7 может привести как к более легкому протеканию заболевания, так и вызывать цитотоксический шторм, вызванного вирусом с одноцепочечной РНК, вследствие развития гипервоспалительного иммунного ответа. Активация этих рецепторных молекул врожденного иммунитета приводит к передаче сигнала окружающим клеткам, что в дальнейшем будет приводить к элиминации вирусных частиц из организма.

В связи с этим в нашем исследовании принимали участие пациенты с COVID-19, у которых заболевание протекало в среднетяжелой степени тяжести. Исследование экспрессионного профиля рецепторных и эффекторных молекул

проводили в динамике как во время протекания заболевания, так и сразу после инфекции COVID-19. В работе были получены следующие результаты изменения уровня экспрессии генов *TLR3*, *TLR7* на уровне слизистых оболочек ВДП (Рисунок 17, Рисунок 18).



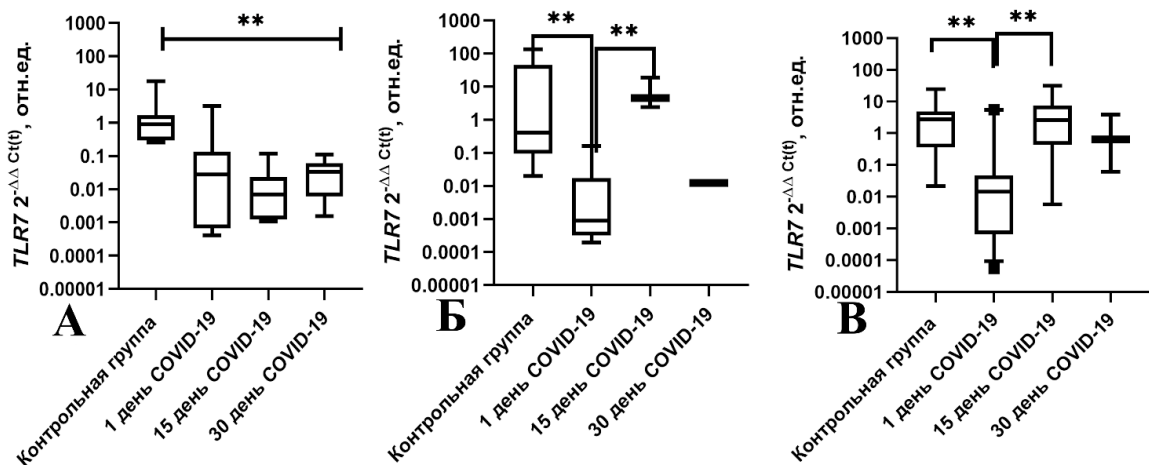
Примечание: По оси ординат Относительные единицы от числа копий  $\beta$ -актина; \* -  $p \leq 0,05$  по тесту Манна Уитни; \*\* -  $0,001 < p \leq 0,05$  по тесту Манна Уитни; \*\*\* -  $p < 0,001$  по тесту Манна Уитни

Рисунок 17 – Экспрессии гена *TLR3* на уровне слизистых оболочек: А- носоглотки, Б- ротоглотки В- ротовой полости у лиц с COVID-19, протекающим в среднетяжелой форме

Выявлено снижение уровня экспрессии гена *TLR3* на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц со среднетяжелым течением COVID-19 [46] (Рисунок 17). Достоверно снижен уровень экспрессии гена *TLR3* на 15 и 30-е сутки заболевания COVID-19 на уровне слизистой оболочки носоглотки в 151,7 и 38,03 раз соответственно относительно группы условно здоровых лиц [46] (Рисунок 17). Статистически значимо снижался уровень экспрессии гена *TLR3* на уровне слизистой оболочки ротоглотки в первые сутки, 15-е сутки и 30 суток относительно контрольной группы в 1 365 раз,  $4,14 \cdot 10^5$  раз и в  $1,88 \cdot 10^5$  раз соответственно [46]. Достоверно снижался уровень экспрессии гена *TLR3* в 303, 3 раз на уровне слизистой оболочки ротоглотки в дебюте заболевания относительно 15 дня от начала заболевания [46]. Относительно слизистой оболочки ротовой полости

достоверных зависимостей найдено не было, однако стоит отметить незначительное снижение уровня экспрессии гена *TLR3* на 30-е сутки от начала заболевания относительно контрольной группы и первых двух недель развития заболевания [46].

Было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии гена *TLR7* на уровне слизистой оболочки носоглотки в период протекания заболевания COVID-19 относительно группы условно здоровых лиц (Рисунок 18) [46]. Уровень экспрессии рецепторной молекулы *TLR7* врожденного иммунитета относительно группы условно здоровых лиц снижался в 32 (31,99) раза в 128,7 раз, в 26,50 раз в первые сутки, на 15-е сутки и 30-е сутки соответственно [46]. На уровне слизистого эпителия ротоглотки наблюдался сниженный уровень экспрессии гена *TLR7* в 455,05 в дебюте заболевания относительно группы условно здоровых лиц [46]. Однако, на 15-тые сутки инфекции статистически значимо возрастал уровень экспрессии гена *TLR7* в  $50 \cdot 10^2$  раз относительно дебюта заболевания [46]. Схожая картина наблюдалась на уровне слизистого эпителия ротовой полости. Как видно из Рисунка 18 достоверно снижался уровень экспрессии гена *TLR7* в 190,2 раз на 1-е сутки от начала заболевания, однако в последующие дни (15-е, 30-е сутки) уровень экспрессии возрастал [46].



Примечание: По оси ординат Относительные единицы от числа копий  $\beta$ -актина; \* -  $p \leq 0,05$  по тесту Манна Уитни; \*\*  $-0,001 < p \leq 0,05$  по тесту Манна Уитни; \*\*\* -  $p < 0,001$  по тесту Манна Уитни

Рисунок 18 – Экспрессии гена *TLR7* на уровне слизистых оболочек: А- носоглотки, Б- ротоглотки В- ротовой полости у лиц с COVID-19, протекающим в среднетяжелой форме

Таким образом, было выявлено, что у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 наблюдался сниженный уровень экспрессии рецепторного аппарата врожденного иммунитета. Такое снижение уровня экспрессии эндосомальных рецепторов врождённого иммунитета можно объяснить действием вирусного генома. Например, ген ORF9b вируса SARS-CoV-2 ингибирует TLR3 и нарушает путь передачи сигнала TLR3-TRIF, что способствует репликации вирусных частиц [124]. Недавние исследования предположили [125], что TLR3 может предотвращать сосудистые изменения на уровне легочной ткани, тем самым снижая экспрессию гена на уровне эндотелиальных клеток. Другое исследование продемонстрировало, что пациенты с среднетяжелой и тяжелой формой заболевания COVID-19 так же имели низкие уровни экспрессии *TLR3* на уровне эпителиальных клеток ВДП [46, 126].

Полученные данные о снижении уровня экспрессии гена *TLR7* у лиц со среднетяжелой формой течения заболевания COVID-19 согласуются с литературными данными [46, 126]. Например, было показано что у лиц как со среднетяжелой, так и с тяжелой формой заболевания COVID-19 наблюдался сниженный уровень экспрессии генов *TLR7/8* на уровне эпителиальных клеток респираторной системы [126].

Важно отметить, что последние исследования уровня экспрессии гена *TLR7* выявили, что половая принадлежность будет играть немаловажную роль в развитии тяжести течения заболевания, поскольку ген *TLR7* связан с X-хромосомой [127, 128]. В работе показано (Рисунок 19), что на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у женщин наблюдался более высокий уровень экспрессии *TLR7* в сравнении с мужчинами. Так, например, уровень экспрессии гена *TLR7* в эпителиальных клетках ротовой полости в 3,3 раза был выше у женщин, чем у мужчин. Немаловажно отметить, что на уровне всех исследуемых слизистых оболочках у мужчин уровень экспрессии был ниже, чем у женщин.



Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше связь, тем насыщеннее градиент цвета

Рисунок 19 – Экспрессия гена *TLR7* на уровне эпителиальных клеток ВДП в зависимости от половой принадлежности

Гомес-Карбалла с соавторами, показали, что уровень экспрессии *TLR7* был снижен на уровне слизистых оболочек носа и в секрете слюнных желез пациентов мужского пола с тяжелой формой COVID-19 по сравнению с пациентами женского пола с тяжелым течением данного заболевания [127].

Эти наблюдения в совокупности позволяют предположить, что дисфункция в работе рецепторных молекул врожденного иммунитета, таких как *TLR3,7*, и их экспрессия с учетом пола может играть важную роль в развитии тяжести течения заболевания COVID-19.

### ***Эффекторные молекулы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при среднетяжелом течении COVID-19***

Врожденный иммунный ответ выступает в роли первичной защиты от вирусных инфекций [53, 129]. Однако, чрезмерная активация эффекторных молекул врожденного иммунитета может вызвать иммунологическое повреждение органов и тканей, которое приводит в конечном счете к полиорганной недостаточности организма в целом [53, 129]. При заболевании COVID-19 происходит гиперпроизводство цитокинов, которое приводит к летальным

исходам. Известно, что в первые дни заболевания COVID-19 происходит замедленная выработка хемокинов, цитокинов в клетках респираторного эпителия. Однако, позднее, в частности после вирусной репликации, возникает гиперактивация и гиперпродукция цитокинов и снижается выработка противовирусных факторов интерферонов.

Считается, что такие цитокины как  $IL1\beta$ ,  $IL28$  и  $TNF\alpha$  и гомологичные им цитокины, такие как  $IL18$  являются важными факторами врожденного иммунного ответа [53, 129]. На следующем этапе работы была проведена оценка экспрессии цитокинов, которые потенциально могут участвовать в развитии воспалительной реакции на уровне слизистых оболочек ВДП при среднетяжелом течении заболевания COVID-19 (Таблица 4).

Было показано (Таблица 4) статистически значимое увеличение уровня экспрессии гена  $IL1\beta$  на уровне слизистых оболочек ротоглотки. Было выявлено достоверное увеличение уровня экспрессии гена  $IL1\beta$  на уровне слизистого эпителия ротоглотки в 4,9 раз на 15-е сутки госпитализации со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 относительно контрольной группы [129]. Также на уровне слизистой оболочки ротоглотки было выявлено статистически значимое увеличение в  $\approx 3,3 \cdot 10^3$  раз на исходе заболевания (30-е сутки) относительно группы условно здоровых лиц [129]. На уровне эпителиальных клеток ротоглотки было так же выявлено статистически значимое увеличение уровня экспрессии гена  $IL1\beta$  в 682 раза на 30-тые сутки с момента госпитализации относительно периода снижения вирусной нагрузки (15-е сутки) [129].

Таблица 4 – Уровень экспрессии молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП у со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 относительно контрольной группы, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Экспрессия гена значения $2\text{-}\Delta\Delta C_t(t)$ , относительные единицы	Среднетяжелое течение заболевания COVID-19									Контрольная группа		
	Носоглотка			Ротоглотка			Ротовая полость			Носоглотка <b>4</b>	Ротоглотка <b>5</b>	Ротовая полость <b>6</b>
	1 е сутки <b>1.1</b>	15-е сутки <b>1.2</b>	30 -е сутки <b>1.3</b>	1 е сутки <b>2.1</b>	15-е сутки <b>2.2</b>	30 -е сутки <b>2.3</b>	1 е сутки <b>3.1</b>	15-е сутки <b>3.2</b>	30 -е сутки <b>3.3</b>			
<i>IL 1<math>\beta</math></i>	13,67 [4,38;18,04]	0,23 [0,09;27,55]	0,28 [0,07;0,70]	11,09 [5,28;126,19]	6,13 [2,02;69,39]	4183,47 [966,53;10505,25]	0,14 [0,02;1,75]	0,5 [0,08;2,03]	0,06 [0,01;6,79]	1,54 [0,20;28,47]	1,25[0,19;14,64]	18,59[3,52;32,37]
<i>IL 18</i>	$8,6 \cdot 10^{-3}$ [ $5,7 \cdot 10^{-3}$ ;0,036]	0,51 [0,15;1,27]	0,48 [0,09;0,87]	$5 \cdot 10^{-3}$ [ $3,5 \cdot 10^{-3}$ ;0,01]	0,12 [0,01;0,37]	0,23 [0,18;0,34]	$3,96 \cdot 10^{-2}$ [0,02;0,05]	0,14 [0,07;1,32]	0,06 [0,01;0,23]	0,69[0,42;5,13]	1,20[0,99;1,28]	3,13[2,95;10,80]
<i>IL 28</i>	0,15 [0,07;2,07]	14,27 [2,16;56,34]	0,07 [0,01;0,93]	$2,3 \cdot 10^{-3}$ [ $4 \cdot 10^{-4}$ ;0,01]	0,05 [0,01;0,16]	0,07 [0,03;0,16]	$5 \cdot 10^{-5}$ [ $1 \cdot 10^{-5}$ ; $1,14 \cdot 10^{-3}$ ]	$2,04 \cdot 10^{-3}$ [ $8 \cdot 10^{-5}$ ; $9,75 \cdot 10^{-3}$ ]	$3 \cdot 10^{-5}$ [ $3 \cdot 10^{-6}$ ; $1,17 \cdot 10^{-3}$ ]	0,18[0,09;16,27]	0,01[0,00;0,03]	12,34[6,92;1061,1]
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	2,368 [1,500;3,717]	0,02 [0,002;0,05]	0,54 [0,16;6,13]	$1 \cdot 10^{-3}$ [ $5 \cdot 10^{-4}$ ;0,02]	0,19 [0,003;1,17]	0,17 [0,04;0,52]	0,05 [0,02;0,57]	8,19 [0,99;18,68]	1,01 [0,07;30,79]	1,95[0,57;5,27]	0,02[0,00;0,05]	0,3[0,06;0,91]

Примечание: статистически значимые результаты. **IL1 $\beta$** .  $P_{2.3/5} = 0,0001^{***}$ ;  $p_{2.2/2.3} < 0,0001^{****}$ ;  $p_{3.1/6} = 0,01^*$ ;  $p_{3.3/6} = 0,0297^*$ ; **IL18**.  $P_{1.1/4} = 0,001^{****}$ ;  $p_{1.3/4} = 0,0254^{***}$ ;  $p_{1.1/1.2} = 0,004^*$ ;  $p_{2.1/5} = 0,0159^*$ ;  $p_{3.1/6} = 0,0079^{**}$ ;  $p_{3.2/6} = 0,001^*$ ;  $p_{3.3/6} = 0,0159^*$ ; **IL28**  $p_{1.1/4} < 0,0001^{****}$ ;  $p_{1.2/4} = 0,0187^*$ ;  $p_{1.3/4} = 0,04^*$ ;  $p_{1.2/1.3} = 0,04^*$ ;  $p_{2.1/5} = 0,0032^{**}$ ;  $p_{2.2/5} = 0,028^*$ ;  $p_{3.1/6} < 0,0001^{****}$ ;  $p_{3.2/6} < 0,0001^{****}$ ;  $p_{3.3/6} < 0,0001^{****}$ ;  $p_{3.1/3.2} = 0,028^*$ ; **TNF- $\alpha$**   $p_{1.1/4} = 0,009^{***}$ ;  $p_{1.3/4} = 0,0043^{**}$ ;  $p_{1.3/1.2} = 0,0008^{***}$ ;  $p_{2.1/5} = 0,007^{**}$ ;  $p_{3.2/6} = 0,015^*$ ; \* -  $p \leq 0,05$  по тесту Манна Уитни; \*\* -  $0,001 < p \leq 0,05$  по тесту Манна Уитни; \*\*\* -  $p < 0,001$  по тесту Манна Уитни; \*\*\*\* -  $p < 0,001$  по тесту Манна Уитни

Увеличение уровня экспрессии *IL1 $\beta$*  у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 на 30 сутки с момента поступления в стационар можно объяснить действием вируса SARS-CoV-2 на иммунную систему. Гипервоспалительная реакция в ответ на вирусную инвазию запускается не с момента заражения, а спустя время, давая тем самым время на вирусную репликацию [130, 131]. Значительное рост уровня экспрессии провоспалительного цитокина *IL1 $\beta$*  на 15-тые и 30-тые сутки с момента поступления в стационар говорят о гипервоспалительной реакцией врожденного иммунитета в момента, когда вирус SARS-CoV-2 почти не реплицирует (8-15-е сутки) [130, 131]. Ко всему прочему, полученные данные об увеличении экспрессии *IL1 $\beta$*  соотносятся с исследованием Verdiguél-Fernández L, Arredondo-Hernández R и др., которые исследовали уровни экспрессии генов провоспалительных цитокинов на уровне слизистых оболочек ротовой полости у лиц с различными степенями тяжести заболевания COVID-19 [132].

На уровне слизистого эпителия ротовой полости наблюдалось статистически значимое снижение уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина *IL1 $\beta$*  в 130 раз и в 299,8 на 1-е и 30-е сутки с момента госпитализации соответственно относительно группы условно здоровых лиц [129]. Заболевание COVID-19 может вызывать изменения в микробиоме, которые могут влиять на уровни экспрессии цитокинов в ротовой полости. В работе Hend Alqedari, Khaled Altabtbaei, Josh L Espinoza было обнаружено что у лиц со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания COVID-19 изменяется микробиом ротовой полости и снижается уровень экспрессии провоспалительных цитокинов, например *IL1 $\beta$*  [133].

Было выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии гомологичного *IL1 $\beta$*  провоспалительного цитокина *IL18* на уровне эпителиальных клеток ВДП у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 (Таблица 4) [53]. Статистически значимо снижался уровень экспрессии *IL18* на уровне слизистой оболочки носоглотки в 80 раз, в 1,3 раза и в 1,4 раза на 1-е сутки, 15-е сутки и 30 сутки с момента поступления в стационар соответственно относительно группы контроля [53]. Так же было показано достоверное снижение уровня

экспрессии *IL18* на уровне слизистых ротоглотки в 240 раз на первые сутки поступления в стационар относительно группы условно здоровых лиц [53]. Наблюдалось снижение уровня экспрессии в 79 раз, в 22,3 раза и в 52,1 раз на уровне слизистой оболочки ротовой полости в течении всего протекания заболевания COVID-19 соответственно (1, 15, 30 сутки стационарного лечения) относительно группы условно здоровых лиц [53].

Полученные результаты снижения уровня IL-18 и ослабление его основных функций возможно из-за действия нескольких механизмов. На уровне эпителия слизистой оболочки накапливается достаточное количество IL-18BP, который создает петлю отрицательной обратной связи посредством взаимодействия с IL-18 и ингибирования его клеточных реакций, таких как выработка IFN- $\gamma$  [134]. Не стоит забывать и о том, что IL-18 опосредует экспансию В-клеток в лимфатических узлах и продукцию ими антител IgA и IgG. Увеличение уровня антител на ранних этапах заболевания, как было показано в ряде исследований, отрицательно коррелировало с уровнями IL-18 в слизистой оболочке носоглотки ВДП [135].

В случае заболевания COVID-19 семейство интерферонов может выступать в роли прогностических маркеров тяжести течения заболевания COVID-19 [136]. Интерфероны III типа (IFN $\lambda$ ) играют ключевую роль во время инфекции SARS-CoV-2, а в нескольких исследованиях сообщалось, что интерфероны III типа проявляют *in vitro* анти-SARS-CoV-2 эффекты [137]. Ко всему прочему, интерфероны типа III или интерфероны  $\lambda$ 1-3, играют важную роль в противовирусной защите эпителиальных барьеров. Поскольку у вируса SARS-CoV-2 существуют различные стратегии уклонения от врожденного иммунологического ответа, стоило рассмотреть самый не очевидный путь запуска врожденных реакций, а именно через экспрессию IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B). В работе получены следующие результаты (Таблица 4).

Экспрессия гена *IL28B* на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 была разнонаправленной. Достоверно снижался уровень экспрессии *IL28B* на уровне слизистых оболочек носоглотки в 1,2 и в 2,6 раз у лиц со среднетяжелым течением заболевания

COVID-19 на 1-е сутки и 30-е сутки поступления в стационар соответственно относительно контрольной группы. Однако, статистически значимо увеличивался уровень экспрессии *IL28B* в 79,2 раза у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 на 15-е сутки с момента поступления в стационар относительно группы условно здоровых лиц. Такое же увеличение наблюдалось на уровне слизистого эпителия ротоглотки. Было выявлено достоверное снижение в 4,3 раза уровня экспрессии *IL28B* на первые сутки, с последующим увеличением в 5 раз уровня экспрессии на 15-е сутки стационарного лечения. На уровне слизистых оболочек ротовой полости наблюдалось достоверно сниженный уровень экспрессии гена *IL28B* в период протекания всего заболевания в контрольных точках: 1-е сутки, 15-е сутки, 30-е сутки в  $2,46 \cdot 10^5$  раз, в  $6 \cdot 10^3$  раз и в  $4,11 \cdot 10^4$  раза соответственно относительно группы условно здоровых лиц. Однако, стоит отметить, что относительно первых суток с момента поступления в стационар наблюдалось статистически значимое увеличение уровня экспрессии в 41,4 раз на 15-е сутки стационарного лечения среднетяжелого течения заболевания COVID-19. Такое снижение уровня экспрессии гена *IL28B* на уровне эпителиальных клеток ВДП особенно в первые сутки поступления в стационар может быть вызвано задержкой выработки и экспрессией интерфернов 3 типа [138]. Спозито и его коллеги, показали, что выработка IFN- $\lambda$  происходит в определённые сроки вирусной инфекции [139]. Так же хочется отметить, что Bianca Vezzani и коллеги отмечают, что на уровне эпителиальных клеток БАЛ, у лиц с тяжелым течением заболевания COVID-19 наблюдается высокие уровни экспрессии  $IL1\beta$  и низкие уровни экспрессии IFN- $\lambda$  [138]. Полученные данные позволяют предположить, что на уровне мукозальной иммунной системы у лиц со среднетяжелым течением происходит снижение уровня экспрессии факторов противовирусной защиты в первые сутки с момента госпитализации, что возможно влияет на тяжесть течения заболевания.

Как было сказано ранее, скоординированный иммунный ответ при вирусной инфекции приводит к усилению продукции различных цитокинов [129]. Однако у людей с заболеванием COVID-19, нарушена регуляция выработки цитокинов,

поэтому интересно было посмотреть уровень экспрессии провоспалительного цитокина *TNF- $\alpha$*  на уровне слизистых оболочек ВДП (Таблица 4). Выявлено статистически значимое увеличение экспрессии гена *TNF- $\alpha$*  на уровне слизистой оболочки носоглотки в 1,2 раза в первые сутки госпитализации относительно группы условно здоровых лиц [129]. Интересно отметить, что уровень экспрессии гена *TNF- $\alpha$*  существенно снижался на 15-е сутки и достоверно снижался в 3,6 раз на 30-е сутки с момента госпитализации относительно группы условно здоровых лиц. В эпителиальных клетках ротовой полости также наблюдается рост экспрессии провоспалительного цитокина. Выявлено увеличение уровня экспрессии гена *TNF- $\alpha$*  в 27,3 раза на 15-е сутки с момента поступления в стационар относительно группы условно здоровых лиц [129]. В то время как, на уровне ротоглотки наблюдалось достоверное снижение в 20 раз уровня экспрессии гена *TNF- $\alpha$*  на 1-е сутки с момента поступления в стационар относительно группы условно здоровых лиц. Однако, при дальнейшем наблюдении выявлена тенденция к увеличению уровня экспрессии гена *TNF- $\alpha$*  в ротоглотке [46, 129].

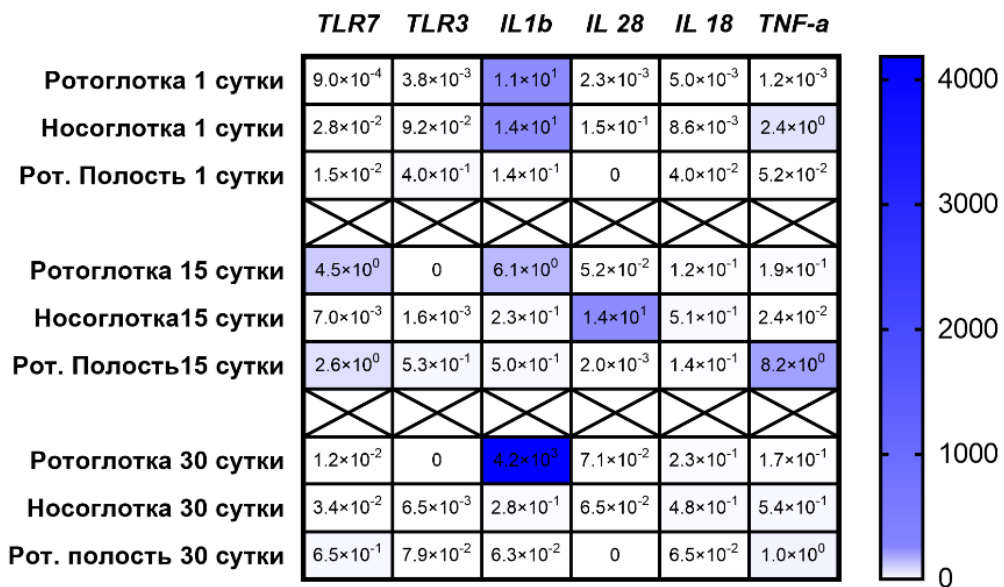
Увеличение уровня экспрессии *TNF- $\alpha$*  как на системном уровне, так и на уровне слизистых оболочек (носоглотка, ротовая полость) при тяжелом течении заболевания наблюдалось и другими авторами. Qing Ye, Bili Wang связывали высокие уровни экспрессии этого цитокина с развитием тяжелого острого респираторного дистресс синдрома больных пациентов [140]. Исследовательская группа Deschler S., показала, что клетки МАИТ (инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой) экспрессируют высокие уровни провоспалительных цитокинов [141].

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что увеличение экспрессии генов эффекторных молекул врожденного иммунитета происходит преимущественно на слизистой оболочки носоглотки. Именно на уровне эпителия носоглотки происходит первичный контакт вируса с клетками организма и именно там начинается разворачиваться иммунологический ответ. Так же стоит отметить, что из всех эффекторных молекул врожденного иммунитета, которые исследовались в данной работе гиперэкспрессия в эпителиальных клетках

ВДП была у *IL1 $\beta$* , в то время как *IL18* на уровне слизистых оболочек ВДП показывал сниженные значения. Так же, стоит отметить, что уровень экспрессии и противовирусных факторов (*IL28*) и противовоспалительных факторов (*TNF $\alpha$* ) имел разнонаправленный характер. Как было сказано ранее, высокий уровень экспрессии исследуемых молекул был зарегистрирован на уровне эпителиальных клеток носоглотки, однако на уровне эпителиальных клеток ротовой полости и ротоглотки сначала экспрессия молекул снижалась (в первые сутки поступления в стационар) а потом увеличивалась. Возможно такое поведение слизистых оболочек обусловлено действием вируса SARS-CoV-2 на эпителиальные клетки ВДП. Но не стоит и исключать, возможность поддержания гомеостаза в экспрессии эффекторных молекул врождённого иммунитета. Такое снижение экспрессии факторов врождённого иммунитета на уровне слизистых ротовой полости и ротоглотки, на фоне увеличения этих молекул в носоглотке может быть обусловлено единой и общей системой мукозального иммунитета CMIS (common mucosal immune system) [47]. Единое происхождение иммуноцитов и единая рециркуляция лимфоидных клеток обеспечивает эффективную защиту слизистых оболочек.

Суммируя вышесказанное было обнаружено, что у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 (Рисунок 20) наблюдался сниженный уровень экспрессии рецепторного аппарата врожденного иммунитета таких как *TLR3*, *TLR7*, в период протекания всего заболевания (1-е, 15-тые, 30-тые сутки с момента поступления в стационар). Однако, уровень экспрессии эффекторных молекул врожденного иммунитета имел разнонаправленный характер у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 относительно условно здоровых лиц [53, 129]. В то время как у словно здоровых лиц уровень экспрессии гена *IL1 $\beta$*  повышался на уровне слизистой оболочки ротовой полости у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 он снижается в период протекания заболевания, однако наблюдается общее увеличение этого гена в слизистой оболочке ротоглотки. Аналогичная картина наблюдается и с уровнем экспрессии гена *IL28*. В то время как у условно здоровых лиц наблюдается высокий

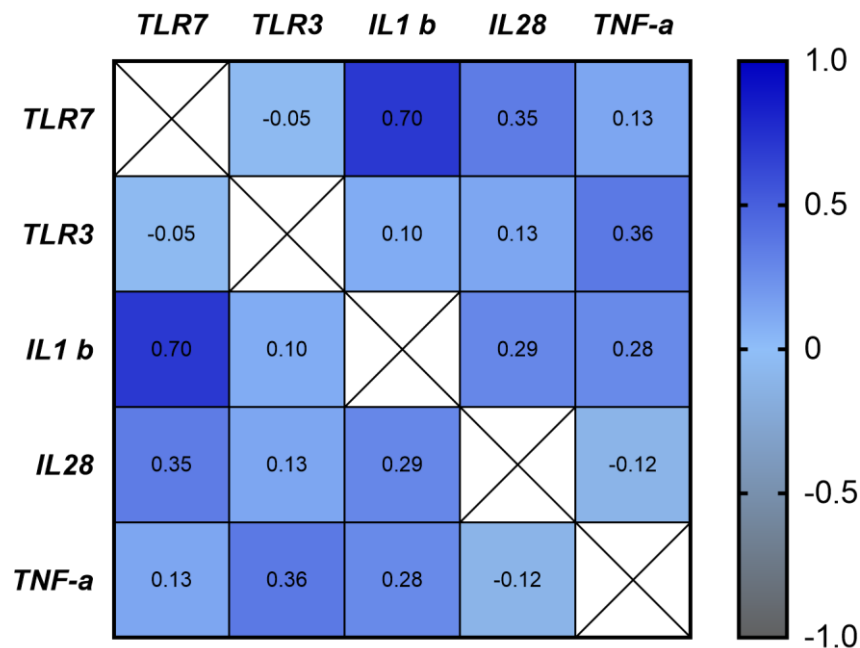
уровень экспрессии гена *IL28* на уровне слизистой оболочки ротоглотки, у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 наблюдается снижение в слизистой той же локализации период протекания всего заболевания (1-е, 15-ые, 30-ые сутки с момента поступления в стационар). Таким образом у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 наблюдается сниженный уровень экспрессии рецепторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Такое снижение рецепторного аппарата может объясняться действием вирусных генов на врожденный иммунный ответ, блокируя или меняя пути передачи сигнала к эффекторным молекулам [142]. Данные изменения в молекулярных механизмах влечет за собой изменения уровня экспрессии и эффекторных молекул врожденного иммунитета вызывая тем самым дисбаланс в организме и влечет за собой нарушения как в сторону гипервоспалительной реакции, так и в сторону снижения противовирусного иммунного ответа [142, 143].



Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше связь, тем насыщеннее градиент цвета

Рисунок 20 – Уровень экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19

Согласно современным данным молекулярной биологии, имеется множество генов, обладающих способностью индуцировать уровень экспрессии других генов. Эти регуляторные гены могут функционировать через различные механизмы, включая, взаимодействиями с белками, а также с помощью микроРНК и других некодирующих молекул, способных влиять на процесс транскрипции и посттранскрипционной модификации мРНК. Таким образом, взаимодействие между генами также играет роль в сложных сетях регуляции генетической активности, что способствует разнообразию клеточных функций и адаптации организма. Данные корреляционного анализа показали наличие сильной взаимосвязи между *IL1 $\beta$*  и *TLR7* на уровне слизистой оболочки ротовой полости (Рисунок 21).

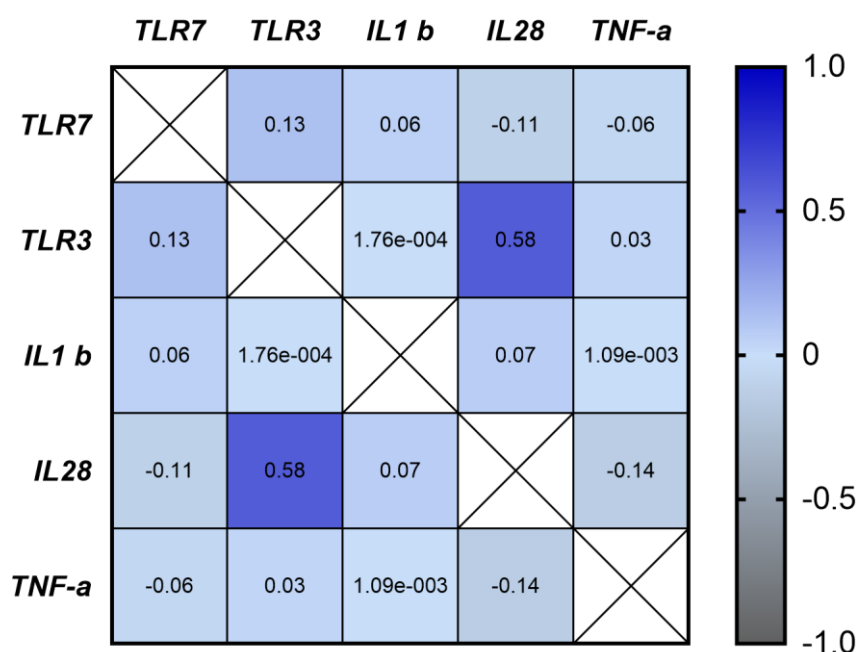


Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше связь, тем насыщеннее градиент цвета

Рисунок 21 – Сила взаимосвязи между переменными (значения экспрессии  $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ) на уровне слизистых оболочек ротовой полости у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 определялась с помощью коэффициента корреляции r-Спирмена ( $p < 0,05$ )

Не смотря на снижение уровня экспрессии *IL1 $\beta$*  на уровне слизистых оболочек ротовой полости, наличие сильной взаимосвязи между *IL1 $\beta$*  и *TLR7* может

объясняться тем фактом, что при тяжелом затяжном воспалительном процессе регуляторные Т клетки могут подавлять экспрессию  $IL1\beta$  на уровне слизистых оболочек ротовой полости [144]. Ко всему прочему, возможна активация альтернативных путей воспаления или другие цитокиновые сети в ответ на активацию TLR7, если  $IL1\beta$  не экспрессируется в достаточном количестве. Это может привести к адекватной иммунной реакции без значительного повышения уровня  $IL1\beta$  [145]. Данные корреляционного анализа выявили наличие сильной взаимосвязи между  $IL28$  и  $TLR3$  на уровне слизистой оболочки носовой полости (Рисунок 22).



Примечание: Данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше связь, тем насыщеннее градиент цвета

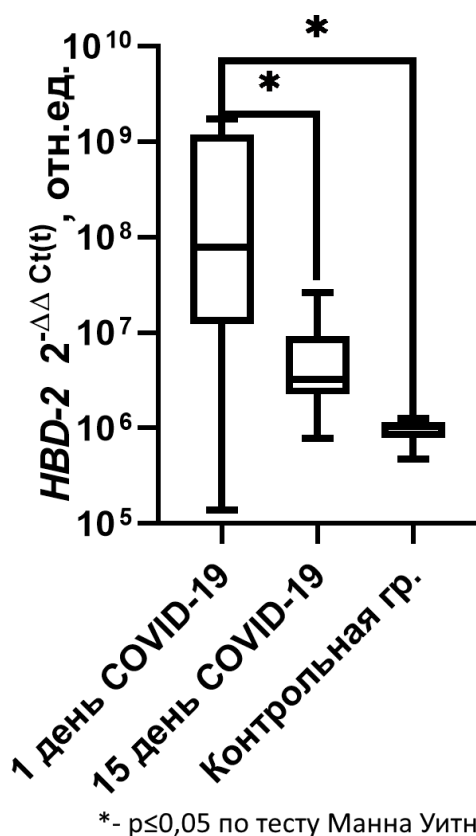
Рисунок 22 – Сила взаимосвязи между переменными (значения экспрессии  $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ) на уровне слизистых оболочек носоглотки у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 определялась с помощью коэффициента корреляции r-Спирмена ( $p < 0,05$ )

Экспрессия  $TLR3$  может приводить к активации сигналов, которые способствуют выработке  $IL-28$ , что, в свою очередь, усиливает противовирусный ответ и поддерживает защиту слизистой оболочки. Эта взаимосвязь может служить

ключевым механизмом в обеспечении противовирусной защиты в ротовой полости.

### *Противомикробный пептид HBD2*

Большая часть противомикробных пептидов способна экспрессироваться по всему респираторному эпителию от полости рта до легких [102]. Поэтому оценка изменения уровня экспрессии гена *HBD2* у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 на уровне слизистых оболочек ротовой полости (Рисунок 23) являлась перспективной задачей.



Примечание: По оси абсцисс время и группы; по оси ординат Относительные единицы от числа копий  $\beta$ -актина

Рисунок 23 – Экспрессия гена *HBD2* на уровне слизистой оболочки ротовой полости

Было выявлено, что экспрессия гена *HBD2* на уровне слизистой оболочки ротовой полости достоверно увеличивается в 73,7 раз на первый день

госпитализации с диагнозом COVID-19 относительно контрольной группы (Рисунок 23). Однако, на 15 сутки экспрессия  $\beta$ -дефензина имеет тенденцию к снижению в 24 раза относительно 1 дня, но уровень экспрессии все равно остается выше, чем у группы условно здоровых лиц. Такой высокий уровень экспрессии гена *HBD2* на уровне слизистых оболочек ротовой полости в первые сутки от начала заболевания может указывать на механизм активации протективного действия HBD2 в ответ на инвазию вируса SARS-CoV-2 [94]. Противовирусные эффекты HBD2 могут быть связаны с прямым воздействием на репликацию вируса или опосредованно с помощью активации противовирусного ответа. Помимо этого, было описано, что различные провоспалительные цитокины участвуют в увеличении экспрессии. Увеличение экспрессии *HBD2* на уровне слизистых оболочек ротовой полости может указывать на то, HBD2 связывается с компонентами вируса SARS-CoV-2, предотвращая тем самым вирусную инвазию. Liqun Zhang, ProfileSantosh K. Ghosh и др., показали, что на биохимическом и биофизическом уровне HBD2 связывается с участком SARS-CoV-2-RBD, предотвращая его связывание с клетками, экспрессирующими АПФ2 [100]. Недавние, биофизические и биохимические исследования подтвердили, что HBD-2 связывается с рецептором вируса SARS-CoV-2 (а именно с RBD), а также предотвращает его дальнейшее связывание с ангиотензин превращающим ферментом 2 [146].

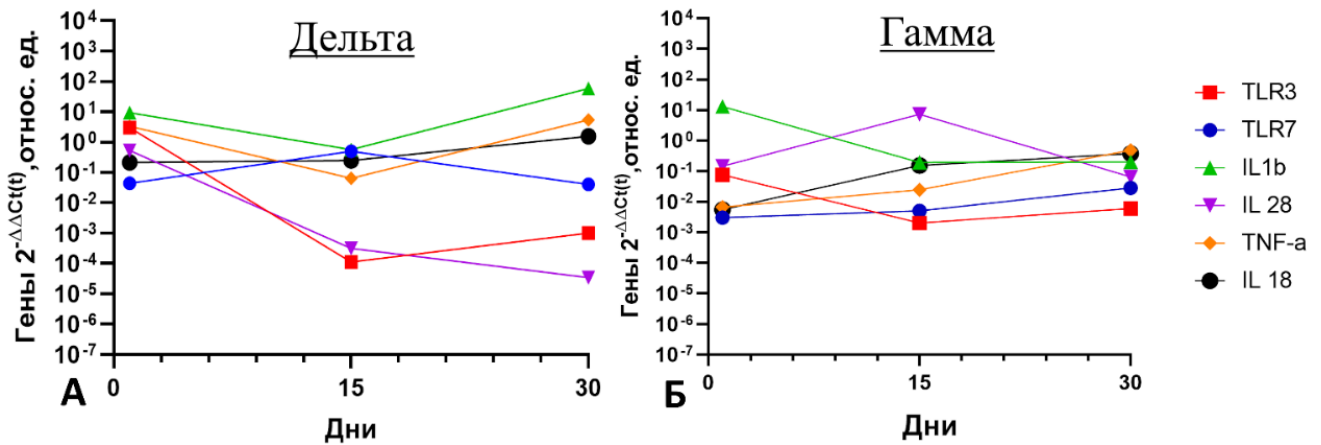
Таким, образом, увеличение экспрессии такого противомикробного пептида, как HBD2, на уровне мукозального иммунитета слизистых оболочек ротовой полости, у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19, может указывать на протективную роль АМП в рамках респираторных вирусных заболеваний. Следствием этого можно предположить факт использования класса  $\beta$ -дефензинов человека для подбора как противовирусной терапии, так и для общего поддержания иммунитета при тяжелых вирусных инфекциях.

### 3.3. Изменения экспрессионного профиля молекул врожденного иммунитета у лиц со среднетяжелым течением COVID-19 в зависимости от штамма

Хорошо известно, что клинические особенности COVID-19 могут варьироваться в зависимости от преобладающего штамма [147]. Каждый вариант вируса SARS-CoV-2 имеет разные характеристики. Например, вариант Омикрон показал более высокую трансмиссивность по сравнению с другими вариантами [32, 33]. Сравнение степени тяжести и смертности между инфекциями, вызванными штаммами Гамма и Дельта COVID-19, выявляет существенные различия между ними [148]. Дельта вариант вируса SARS-CoV-2 связан со значительно более высоким риском госпитализации по сравнению с вариантом Гамма [149]. Исследования показали, что риск госпитализации пациентов, инфицированных Дельта штаммом, был примерно в 2,16 раза выше, чем у пациентов, инфицированных вариантом, Гамма штаммом [149]. Ко всему прочему, Дельта вариант вируса SARS-CoV-2 связан с длительным временем выделения вируса, что может способствовать стойкому ухудшению состояния здоровья. Хотя прямое сравнение штамма Гамма со штаммом Дельта не проводилось, в одном исследовании была отмечена более высокая распространенность неврологических симптомов у пациентов, инфицированных вариантом, Дельта [149]. Таким образом, на системном уровне существуют отличительные особенности каждого варианта вируса SARS-CoV-2, однако на уровне иммунной системы слизистых оболочек таких исследований проводилось недостаточно. Поэтому интересно было сравнить уровни экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на локальном уровне относительно штамма заболевания. В работе получены следующие результаты (Рисунок 24, Рисунок 25, Рисунок 26).

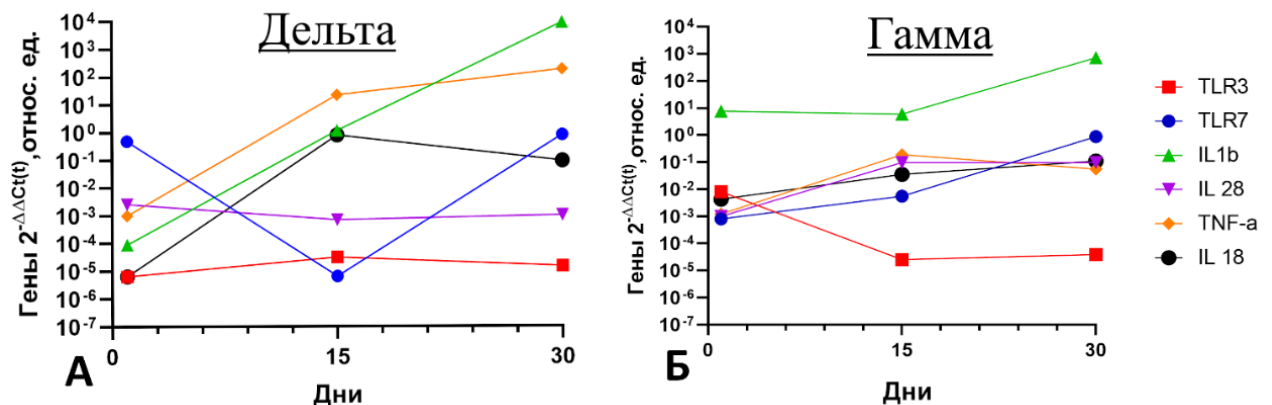
На уровне эпителиальных клеток носоглотки у лиц, инфицированных Дельта вариантом (Рисунок 24) было выявлено снижение уровней экспрессии *TLR3* и фактора противовирусной защиты организма *IL28*. Такое снижение уровне экспрессии молекул врожденного иммунитета может говорить о тяжести протекания заболевания COVID-19 при инфицировании Дельта вариантом. Как

было сказано ранее, Дельта вариант вируса SARS-CoV-2 связан с более тяжелым клиническим проявлением заболевания COVID-19. Сравнение тяжести течения вариантов Гамма и Дельта выявило, что при Дельта варианте вируса SARS-CoV-2 пациенты чаще нуждались в ИВЛ и кислородной поддержке [150]. Стоит также отметить, что Nawon Lee и его коллеги выявили, что у пациентов с более тяжелым поражением легких (КТ 2-3 степени) выявлялись низкие уровни экспрессии *TLR3* и факторов противовирусной защиты [123, 150].



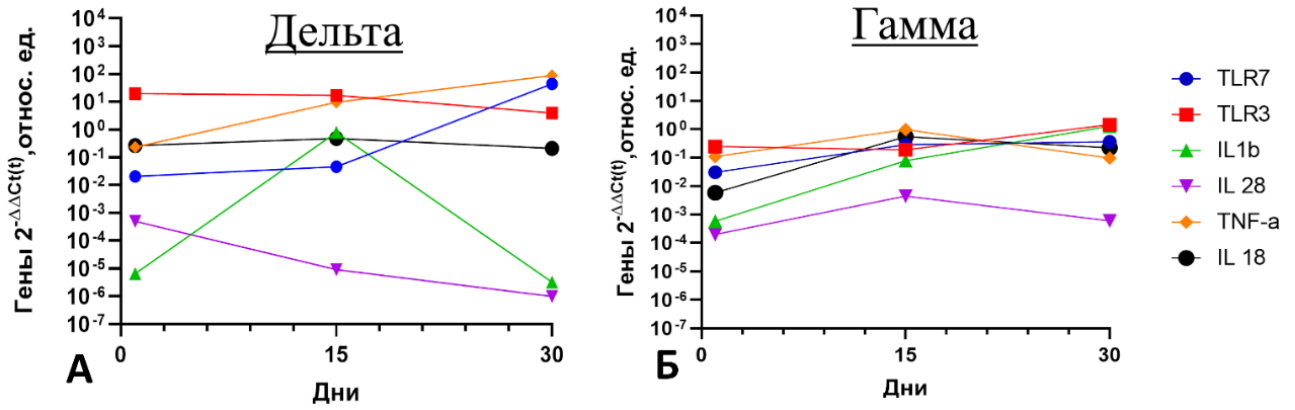
Примечание: По оси абсцисс время и группы; по оси ординат Относительные единицы от числа копий  $\beta$ -актина

Рисунок 24 – Сравнение динамики экспрессии генов эффекторных и рецепторных молекул врожденного иммунитета на уровне носоглотки при дельта(А) и гамма(Б) штаммах COVID19



Примечание: По оси абсцисс время и группы; по оси ординат Относительные единицы от числа копий  $\beta$ -актина

Рисунок 25 – Сравнение динамики экспрессии генов рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне ротоглотки при дельта(А) и гамма(Б) штаммах COVID19



Примечание: По оси абсцисс время и группы; по оси ординат Относительные единицы от числа копий  $\beta$ -актина

Рисунок 26 – Сравнение динамики экспрессии генов рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне ротовой полости при дельта(А) и гамма(Б) штаммах COVID19

Как видно из Рисунка 25 при инвазии Гамма штаммом вируса SARS-CoV-2 лиц со среднетяжелым течением COVID-19 наблюдался повышенный уровень экспрессии гена  $IL1\beta$  в эпителиальных клетках ротоглотки в первые сутки с момента поступления в стационар с последующим ростом. Повышенный уровень экспрессии  $IL1\beta$  создает провоспалительное микроокружение в эпителиальных клетках ротоглотки, что приводит к изменению профиля цитокинов. Повышенный уровень экспрессии  $IL1\beta$  способствует воспалению поверхностей слизистых оболочек, выстилающих ротоглотку и носоглотку. Возникшее воспаление может привести к таким симптомам, как боль в горле, затруднение глотания, а также изменения вкуса и запаха, которые характерны для заболевания COVID-19 [151]. Стоит отметить, что при исследовании уровня экспрессии  $IL1\beta$  на уровне ротоглотки при инфицировании дельта вариантов вируса SARS-CoV-2 (Рисунок 25) так же наблюдалось увеличение уровня его экспрессии. Однако, в отличии от гамма штамма дельта вариант продемонстрировал исходно низкие уровни экспрессии с последующим увеличением в более чем 10 раз (на 30-тые сутки). Известно, что дельта вариант вируса SARS-CoV-2 характеризуется как более тяжелым течением, так и тяжелым клиническим проявлением включая неврологические нарушения. Имеются данные, свидетельствующие о том, что  $IL1\beta$  при определенных условиях может преодолевать гематоэнцефалический барьер,

что приводит к неврологическим симптомам, таким как спутанность сознания, головокружение и нарушение когнитивных функций. Хотя эти симптомы менее распространены, они могут возникать в тяжелых случаях вирусных инфекций, включая заболевание COVID-19 [149, 151].

Помимо этого, нами было выявлено увеличение уровня экспрессии IFN $\lambda$ 3 (IL28) на уровне слизистых оболочек ВДП на 15-тые сутки стационарного лечения при гамма варианте вируса SARS-CoV-2 (Рисунок 24). Особенно высокий уровень экспрессии IFN $\lambda$ 3 (IL28) при инвазии гамма штаммом отмечался на уровне эпителиальных клеток носоглотки (Рисунок 24, Б). Интерферон лямбда (IFN- $\lambda$ ) играет решающую роль в иммунном ответе против респираторных вирусных инфекций. Особенно важен IFN $\lambda$ 3 для дыхательных путей, где он действует на эпителиальные клетки, опосредуя противовирусный ответ. Эпителиальные клетки ВДП особенно эпителиальные клетки носоглотки и бронхов экспрессируют IFN $\lambda$ 3 в ответ на различные вирусные инфекции, что указывает на его важность на ранних стадиях репликации вируса в этих тканях [123]. Однако, при инвазии Дельта штаммом нами было выявлено снижение уровня экспрессии IFN $\lambda$ 3 на уровне слизистых оболочек ВДП (Рисунок 26, А). Особенно сниженный уровень экспрессии IFN $\lambda$ 3 наблюдался на уровне слизистых оболочек ротовой полости (Рисунок 26, А). Стоит отметить, что и при Гамма варианте вируса SARS-CoV-2 (Рисунок 26, Б) наблюдался сниженный уровень IFN $\lambda$ 3, однако при дельта штамме на уровне ротовой полости происходит снижение экспрессии фактора противовирусной защиты приблизительно в 100 раз. Снижение экспрессии лямбда-интерферона (IFN- $\lambda$ ) в полости рта может иметь серьезные последствия для способности организма обеспечивать эффективный противовирусный ответ. IFN $\lambda$ 3 играет решающую роль в модуляции экспрессии интерферон-стимулируемых генов (ISG) и усилении противовирусного иммунитета в эпителии слизистой оболочки полости рта. Это достигается за счет активации ISG в ответ на вирусные раздражители, тем самым способствуя общему защитному механизму против вирусных инфекций [152]. Снижение экспрессии IFN $\lambda$ 3 в полости рта может

поставить под угрозу противовирусную защиту организма, особенно в отношении вируса SARS-CoV-2, инфицирующего слизистую оболочку полости рта.

### **3.4. Экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц, перенесших заболевание COVID-19**

Известно, что вирус SARS-CoV-2 ответственен не только за заболевание легких, но и за полиорганный синдром. После острой инфекции в частности протекающей в среднетяжелом/тяжелом течении, как и при многих других вирусных заболеваниях, описано множество сохраняющихся симптомов, которые включают в себя одышку, стойкое ощущение усталости, когнитивные нарушения, тревожно-психические расстройства личности, подверженность респираторным заболеваниям (ОРЗ) и др. [42]. Все эти данные говорят о том, что иммунная система после заболевания COVID-19 тяжело восстанавливается. По этой причине уровень экспрессии генов молекул врожденного иммунитета у лиц, которые перенесли заболевание COVID-19, расширит понимание в вопросе регуляции иммунного ответа и могут привести к более точным диагностическим инструментам и методам лечения, адаптированным к индивидуальному спектру иммунного ответа пациента. Полученные данные представлены в Таблице 5.

Было выявлено, статистически значимое снижение уровней экспрессии генов рецепторных молекул врожденного иммунитета (*TLR3*, *TLR7*) на уровне эпителиальных клеток ротоглоточного тракта в течении всего периода реабилитации. Однако, на уровне слизистых носоглотки и ротовой полости наблюдалась тенденция к увеличению уровня экспрессии генов молекул врожденного иммунитета таких как *TLRs*. Такое увеличение уровня экспрессии молекул врожденного иммунитета можно объяснить, что экспрессия таких рецепторных молекул врожденного иммунитета как *TLR3*, *TLR7* коррелирует с уровнями воспаления и потенциального повреждения тканей, которое сохраняется после перенесения заболевания COVID-19 [100].

Экспрессия эффекторных молекул врожденного иммунитета таких как, *IL1 $\beta$* , *IL28*, *TNF $\alpha$*  была разнонаправленной. Наблюдалось увеличение уровня экспрессии *IL1 $\beta$*  в эпителиальных клетках слизистой оболочки ротоглотки и носоглотки, в частности было выявлено достоверное увеличение экспрессии *IL1 $\beta$*  в 108,5 раз на уровне эпителиальных клеток носоглотки. Это свидетельствует о том, что уровень экспрессии гена *IL1 $\beta$*  сохраняется высоким как в период среднетяжелого течения COVID-19, так и после перенесенного заболевания COVID-19. Такой высокий уровень экспрессии, как у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19, так и у лиц перенесших данное заболевание на уровне слизистых оболочек именно носоглотки может объясняться ролью *IL1 $\beta$*  в ответ на вирусные инфекции. Данный цитокин участвует 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 инфламасомы для успешной элиминации вирусных частиц. В частности, некоторые исследования говорят о том, что высокий уровень активации воспалительных сом NLRP3, который, в сочетании с *IL18* и *IL1 $\beta$*  отрицательно влияет на функциональную активность мозга [153, 154]. Возможно, именно высокий уровень экспрессии в слизистых эпителия носоглотки и ротоглотки в дальнейшем вызывает когнитивные нарушения.

Таблица 5 – Экспрессионный профиль молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц, перенесших заболевание COVID-19 относительно группы условно здоровых лиц

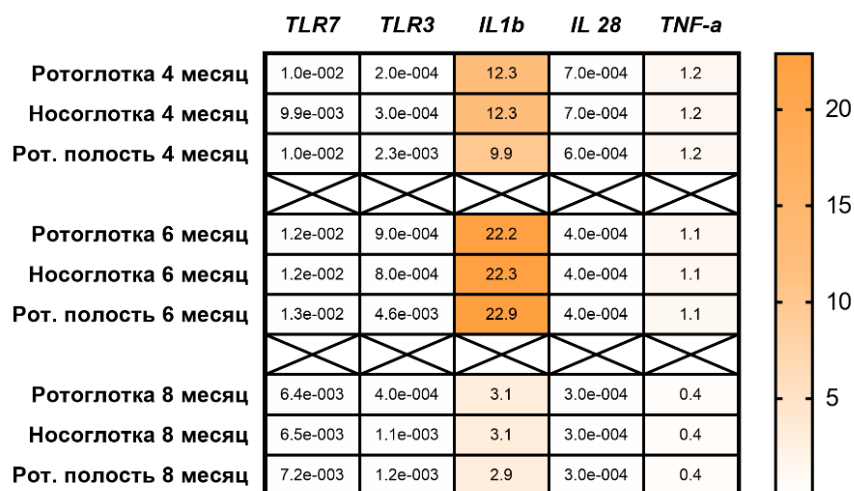
Экспрессия гена значения $2\text{-}\Delta\Delta Ct(t)$ , относительные единицы	Ротоглотка								
	4 месяц			6 месяц			8 месяц		
	Изменение	Me[Q1; Q3]	P	Изменение	Me[Q1; Q3]	P	Изменение	Me[Q1; Q3]	P
<i>TLR3</i>	↓ в $28 \cdot 10^4$	$1,81 \cdot 10^{-5}$ [ $1,75 \cdot 10^{-5}$ ; $2,6 \cdot 10^{-5}$ ]	0,0238	↓ в $11 \cdot 10^4$	$4,47 \cdot 10^{-5}$ [ $6,87 \cdot 10^{-6}$ ; $8,17 \cdot 10^{-6}$ ]	0,0238	↓	$7,37 \cdot 10^{-6}$ [ $6,87 \cdot 10^{-6}$ ; $8,17 \cdot 10^{-6}$ ]	0,6784
<i>TLR7</i>	↓ в 119,4	$7,206 \cdot 10^{-3}$ [ $6,72 \cdot 10^{-3}$ ; $1,09 \cdot 10^{-2}$ ]	0,0101	↓ в 148,3	$5,8 \cdot 10^{-3}$ [ $2,2 \cdot 10^{-3}$ ; $1,19 \cdot 10^{-2}$ ]	0,0005	↓ в 456,07	$1,88 \cdot 10^{-3}$ [ $2,63 \cdot 10^{-4}$ ; $4,09 \cdot 10^{-3}$ ]	0,0005
<i>IL1b</i>	↑	12,26 [5,53;33,34]	0,2949	↑	41,65 [11,24;82,07]	0,1079	↑	3,11 [1,47;13,11]	0,5728
<i>IL28</i>	↓ в 215,5	$8 \cdot 10^{-4}$ [ $6 \cdot 10^{-4}$ ; $2,5 \cdot 10^{-3}$ ]	0,0012	↓ в 278,4	$6 \cdot 10^{-4}$ [ $4 \cdot 10^{-4}$ ; $1 \cdot 10^{-3}$ ]	0,0007	↓ в 533,5	$3 \cdot 10^{-4}$ [ $2 \cdot 10^{-4}$ ; $6 \cdot 10^{-4}$ ]	0,0095
<i>TNF-a</i>	↓	0,59[0,16;1,44]	0,8357	↓	0,33[0,03;1,24]	0,2284	↓ в 34	0,07[0,03;0,18]	0,0992
Экспрессия гена значения $2\text{-}\Delta\Delta Ct(t)$ , относительные единицы	Носоглотка								
	4 месяц			6 месяц			8 месяц		
	Изменение	Me[Q1; Q3]	P	Изменение	Me[Q1; Q3]	P	Изменение	Me[Q1; Q3]	P
<i>TLR3</i>	↑	$4,3 \cdot 10^{-3}$ [ $2,24 \cdot 10^{-4}$ ; $0,211$ ]	0,4079	↑	0,06 [0,02;0,35]	0,0879	↑	0,0053 [0,0011;0,0106]	0,1898
<i>TLR7</i>	↔	$3,45 \cdot 10^{-2}$ [ $2 \cdot 10^{-3}$ ; $4,18$ ]	0,9015	↑	0,22 [0,03;0,25]	0,8048	↔	0,0122 [0,0051;0,0800]	0,2086
<i>IL1b</i>	↑ в 108,5	135,67 [3,30;11332,43]	0,0328	↑	12,75 [3,46;618,55]	0,1259	↑	2,77 [2,27;23,53]	0,3749
<i>IL28</i>	↑	0,01[ $7,8 \cdot 10^{-3}$ ; $1,29$ ]	0,7473	↑	0,01 [ $9,2 \cdot 10^{-3}$ ; $3,38 \cdot 10^{-2}$ ]	0,3489	↑	$9,35 \cdot 10^{-2}$ [ $4,79 \cdot 10^{-2}$ ; $0,1391$ ]	0,6154
<i>TNF-a</i>	↑ в 421,5	25,48[1,03;1588,87]	0,0044	↑ в 184,5	11,16[2,77;121,05]	0,0031	↑ в 23,06	1,39[0,35;7,15]	0,0068
Экспрессия гена значения $2\text{-}\Delta\Delta Ct(t)$ , относительные единицы	Ротовая полость								
	4 месяц			6 месяц			8 месяц		
	Изменение	Me[Q1; Q3]	P	Изменение	Me[Q1; Q3]	P	Изменение	Me[Q1; Q3]	P
<i>TLR3</i>	↑	$1,48 \cdot 10^{-2}$ [ $7,2 \cdot 10^{-3}$ ; $0,12$ ]	0,1416	↑	0,2 [0,01;8,38]	0,0206	↑	0,02[0,01;0,68]	0,2818
<i>TLR7</i>	↑	0,15[0,0094;0,56]	0,9773	↑	0,38 [0,13;3,5]	0,3922	↔	0,04[0,01;0,14]	0,5083
<i>IL1b</i>	↓	0,83[0,09;16,85]	0,1416	↓	0,54 [0,17;24,1]	0,1416	↓	0,85 [0,02;7,39]	0,1135
<i>IL28</i>	↓ в $29 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^{-5}$ [ $3 \cdot 10^{-6}$ ; $1,53 \cdot 10^{-4}$ ]	0,0007	↓ в $41 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^{-5}$ [ $6 \cdot 10^{-6}$ ; $1,54 \cdot 10^{-3}$ ]	0,0007	↓ в $73 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^{-5}$ [ $5,81 \cdot 10^{-6}$ ; $1,08 \cdot 10^{-4}$ ]	0,0007
<i>TNF-a</i>	↔	0,8 [0,43; 1,03]	0,6669	↑	11,12 [0,02;1010,78]	0,2257	↔	0,82 [0,25;6,02]	0,5489

Примечание: ↑- увеличение уровня экспрессии относительно группы условно здоровых лиц. ↓- снижение уровня экспрессии относительно группы условно здоровых лиц. ↔- равнозначный уровень экспрессии с группой условно здоровых лиц. Синим и оранжевым цветом выделены достоверно значимые результаты (при  $p \leq 0,05$  по тесту Крускала - Уоллиса)

Относительно противовирусного фактора врожденного иммунитета IL28 было выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии на уровне слизистых оболочек 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 IFN, в частности IFN $\lambda$ s может сохраняться высоким более чем полгода с момента заболевания COVID-19 [155].

Сохранялся и высокий уровень экспрессии *TNF $\alpha$*  на уровне слизистого эпителия носоглотки. Возможно, такие увеличения экспрессии генов провоспалительных цитокинов на уровне носоглотки как у лиц с среднетяжелым течением заболевания COVID-19, так и у лиц, перенесших данное заболевание, можно объяснить особенностью слизистого эпителия носоглотки.

Суммируя все вышесказанное в группе лиц, перенесших заболевание COVID-19, сохранялся сниженный уровень экспрессии рецепторных молекул врожденного иммунитета в период прохождения реабилитации относительно группы условно здоровых лиц (Рисунок 27). Однако, наблюдался рост экспрессии некоторых эффекторных молекул в период реабилитационного процесса. Как было сказано ранее в группе условно здоровых лиц высокое медианное значение уровня экспрессии *IL1 $\beta$*  было на уровне эпителиальных клеток ротовой полости. В группе лиц, перенесших заболевание, наблюдался высокий уровень значения этого гена на уровне слизистых оболочек ВДП на 4-тый и 6 месяцы прохождения реабилитации. Однако на 8 месяц реабилитации экспрессия гена *IL1 $\beta$*  снижалась на уровне слизистой оболочки ВДП. Такое стойкое повышение уровня экспрессии *IL1 $\beta$*  и других эффекторных молекул (*TNF $\alpha$* ) после перенесённого заболевания COVID-19 может запускать множественные системные и органоспецифичные изменения и потенциально могут быть связаны с клиническими проявлениями «пост-COVID» синдрома [149].



Примечание: данные представлены в виде тепловых диаграмм, чем выше медианное значение уровне экспрессии, тем насыщеннее градиент цвета

Рисунок 27 – Уровни экспрессии молекул врожденного иммунитета у лиц, находящихся на реабилитации

Данные корреляционного анализа вывило наличие сильной взаимосвязи между *IL28* и *TNF $\alpha$*  на уровне слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки в группе лиц, перенесших заболевание COVID-19 (Рисунок 28). Связь между *IL28* и *TNF $\alpha$*  включает сложные взаимодействия в иммунной системе, особенно в контексте воспаления и противовирусных реакций. Как *IL28*, так и *TNF $\alpha$*  играют важную роль в регуляции иммунитета, но они действуют через различные пути и имеют различные основные функции. Было показано, что *IL-28* модулирует воспаление, вызванное *TNF- $\alpha$*  [156]. *IL-28* может косвенно влиять на сигнальные пути, активируемые *TNF- $\alpha$* , потенциально ослабляя чрезмерное воспаление [157]. Эта регуляторная роль *IL28* может иметь решающее значение для поддержания иммунного гомеостаза и предотвращения повреждения тканей, связанного с хроническим воспалением [156, 157].

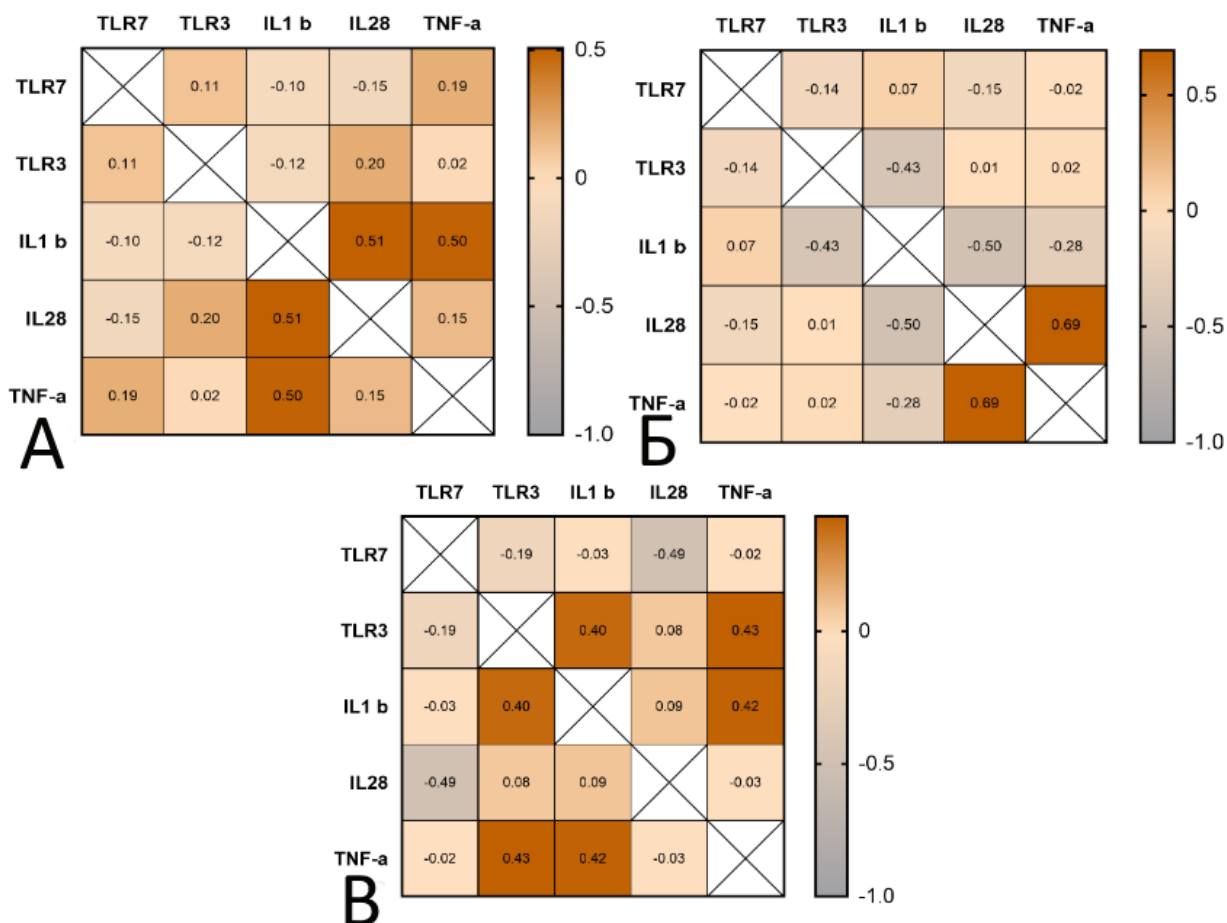


Рисунок 28 – Корреляционный анализ в группе лиц, перенесших заболевание COVID-19 на уровне слизистых оболочек носоглотки (А), ротоглотки (Б), ротовой полости (В)

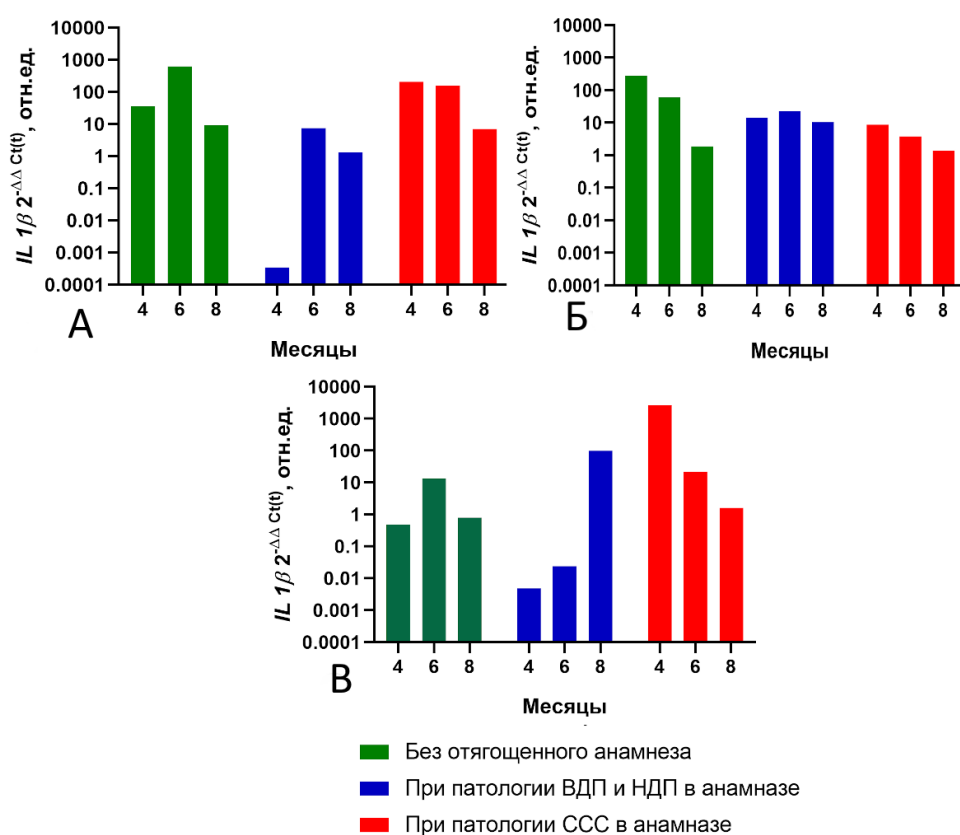
Эти данные свидетельствуют о том, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к стойким изменениям в иммунной системе в течение длительного времени после выздоровления, что имеет важные потенциальные последствия для понимания симптомов, связанных с длительным течением COVID-19. Эти изменения в иммунной системе могут влиять на общее состояние организма поскольку стойкая иммунная активация может также усугублять другие хронические состояния.

### **3.5. Экспрессия провоспалительных цитокинов (IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с отягощённым анамнезом**

После выздоровления от заболевания COVID-19 у людей может возникнуть ряд осложнений хронических заболеваний, особенно если у них была среднетяжелая или тяжелая форма COVID-19. Осложнения хронических заболеваний после перенесенного заболевания COVID-19 могут проявляться в виде полиорганной недостаточности или аутоиммунных состояний, которые длятся неделями, месяцами или даже годами. Воздействие вируса SARS-CoV-2 может затрагивать различные системы организма, включая сердце, легкие, почки, кожу и мозг [154, 155].

Иммунный ответ на первоначальную инфекцию играет значительную роль в развитии состояния длительного COVID, а иммунитет слизистых оболочек имеет решающую роль в защите организма от патогенов, проникающих через поверхности слизистых оболочек. Таким образом, изменения на уровне мукозального иммунитета могут приводить к возникновению или рецидиву хронических заболеваний [118]. Например, развитие хронического воспаления или нарушение регуляции иммунной системы слизистой оболочки могут привести к системным эффектам, способствуя развитию или обострению хронических заболеваний [158]. В качестве примера можно привести такое состояние, как хроническое воспаление на поверхности слизистых оболочек, вызванное постоянными инфекциями или аутоиммунными реакциями, которое может поражать отдаленные органы и системы, приводя к таким системным патологиям, как сердечно-сосудистые заболевания, аутоиммунные заболевания (ревматоидный артрит, целиакия и др.), воспалительные заболевания ЖКТ (болезнь Крона, язвенный колит и др.) и другие [159, 160]. Согласно научной литературе эффекторные молекулы врожденного иммунитета влияют на многие хронические заболевания (в том числе на вирусные заболевания). Эффекторные молекулы врожденного иммунитета играют важную роль в развитии миалгического энцефаломиелита/синдрома хронической усталости (МЭ/СХУ) [161], которые по

симптоматике схоже с хроническим состоянием характерным после заболевания COVID-19. Совокупность этих данных позволяет предположить, что молекулы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек влияют на обострение существующих хронических заболеваний. Поэтому интересным представлялось оценить экспрессию некоторых эффекторных молекул врожденного иммунитета и их уровни экспрессии у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с хроническими патологиями в анамнезе. В работе получены следующие результаты (Рисунок 29, Рисунок 30).



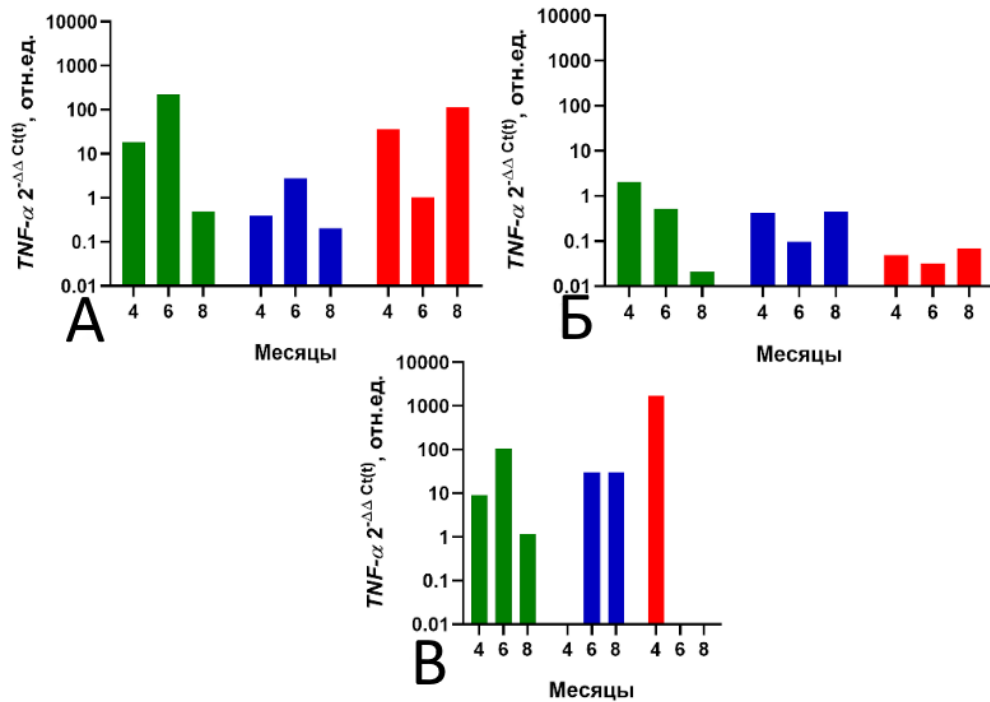
Примечание: Зеленым цветом показана группа без отягощенного анамнеза; Синим цветом показана группа с хроническими респираторными заболеваниями (патология Верхних и Нижних дыхательных путей); Красным цветом показана группа с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы

Рисунок 29 – Экспрессия *IL1β* на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с хроническими заболеваниями в анамнезе

Известно, что *IL1β* представляет собой провоспалительный цитокин, участвующий в системном воспалении, и является важным медиатором

врожденного иммунного ответа. Он играет решающую роль в патогенезе различных воспалительных заболеваний, включая хронические респираторные заболевания, такие как астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и идиопатический фиброз легких [100]. Было выявлено (Рисунок 29, В) увеличение уровня экспрессии *IL1 $\beta$*  на уровне слизистой оболочки ротовой полости на 8-ой месяц реабилитационного процесса у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с хроническими респираторными заболеваниями. Увеличение экспрессии *IL1 $\beta$*  при хронических респираторных патологиях хорошо известно. Уровни экспрессии *IL1 $\beta$*  в сыворотке крови значительно выше у пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми [162]. *IL1 $\beta$*  стимулирует нормальные эпителиальные клетки бронхов человека вырабатывать воспалительные цитокины, такие как *IL6* и *IL8*, которые способствуют рекрутированию и активации нейтрофилов. Кроме того, *IL1 $\beta$*  может увеличивать количество Т-лимфоцитов, продуцирующих *IL17*, усиливая рекрутирование нейтрофилов в дыхательные пути. Это создает порочный круг нейтрофильного воспаления дыхательных путей, способствуя прогрессирующему развитию ХОБЛ [163].

Также стоит отметить, наблюдался рост уровня экспрессии на уровне слизистых оболочек (носоглотки и ротовой полости) *IL1 $\beta$*  у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с хронической патологией сердечно-сосудистой системы в анамнезе (Рисунок 29). Хронические сердечно-сосудистые заболевания часто сопровождаются воспалением, и как было сказано ранее, *IL1 $\beta$*  является одним из ключевых медиаторов воспалительного процесса [81]. Чрезмерная активация *IL1 $\beta$*  может способствовать повреждению эндотелия сосудов и усугублять хронические ССС заболевания. Такой повышенный уровень экспрессии исследуемого провоспалительного цитокина на уровне слизистой оболочки ротовой полости у лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания, и с длительной ССС патологией может способствовать развитию гипервоспалительной реакции на системном уровне и способствовать ухудшению состояния здоровья.



Примечание: Зеленым цветом показана группа безотягощенного анамнеза; Синим цветом показана группа с хроническими респираторными заболеваниями (патология Верхних и Нижних дыхательных путей); Красным цветом показана группа с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы

Рисунок 30 – Экспрессия  $TNF-\alpha$  на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с хроническими заболеваниями в анамнезе

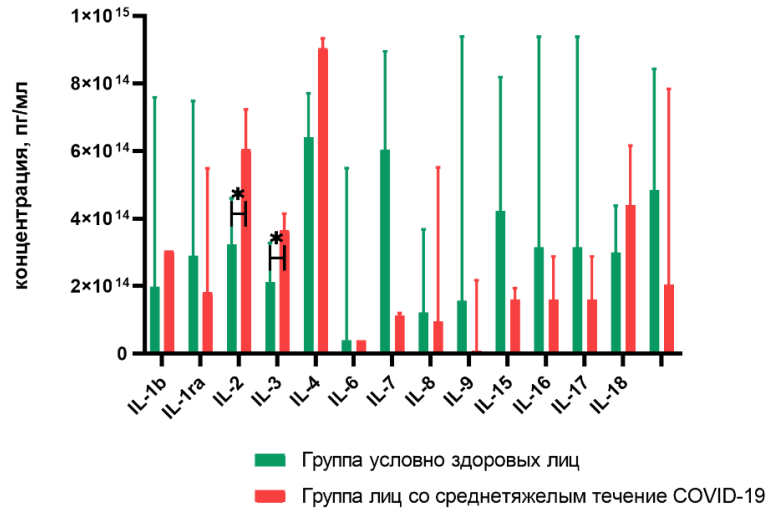
Исследование экспрессии  $TNF\alpha$  на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц с хроническими заболеваниями в анамнезе показало (Рисунок 30 А, В) увеличение экспрессии гена данного провоспалительного цитокина на уровне слизистых оболочек носоглотки и ротовой полости у лиц хроническими заболеваниями ССС. Повышенные уровни экспрессии  $TNF\alpha$  на системном уровне характерны для патологии сердечно-сосудистой системы [164, 165]. Наши данные позволяют предположить, что нарушения со стороны иммунной системы слизистой оболочки могут привести к усилению системного воспаления, которое связано с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Таким образом, поддержание мукозальной иммунной системы может иметь решающее значение для предотвращения или смягчения сердечно-сосудистых осложнений.

### **3.6. Оценка белкового профиля цитокинов и sIgA при исследуемой инфекции на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей**

В ходе инфекционного процесса наблюдается сложное взаимодействие между вирусом и иммунной системой, что приводит к разнообразным клиническим проявлениям заболевания. Одним из ключевых компонентов иммунного ответа являются цитокины, которые играют важную роль в регуляции воспалительных процессов. Известно, что при COVID-19 уровень цитокинов значительно изменяется, что связано с развитием как системного воспалительного ответа, так и локальных реакций в слизистых оболочках дыхательных путей.

При COVID-19 нарушение мукозальной функции может способствовать тяжелым формам заболевания и осложнениям, таким как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). Изучение уровня цитокинов как на системном, так и на локальном уровне позволит улучшить понимание о патогенезе COVID-19. В работе получены следующие результаты (Рисунок 31, Рисунок 32).

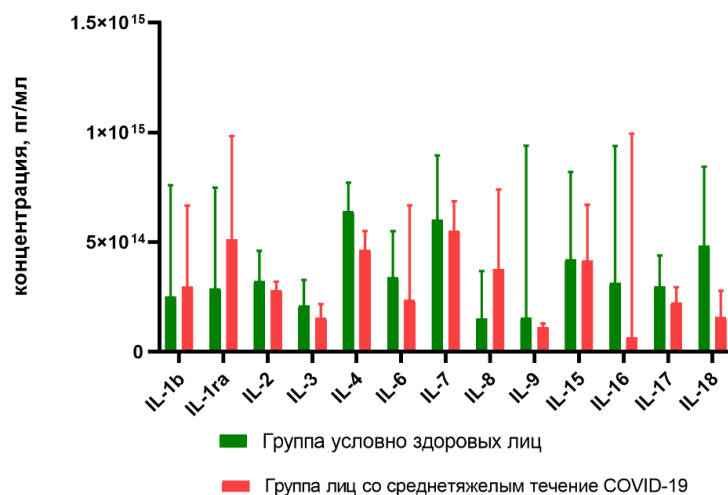
Производство цитокинов у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 показало статистически значимое увеличение в 1,8 раз продукции IL2 на уровне слизистых оболочках ротоглотки, а также достоверное увеличение продукции IL3 в 1,6 раз относительно группы здоровых лиц (Рисунок 31). Эти цитокины участвуют в регуляции иммунного ответа, включая взаимодействие клеток, дифференцировку и активацию лимфоцитов. Так, например, IL2 является фактором пролиферации и активации Т-лимфоцитов, особенно CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток [166]. Эти клетки играют центральную роль в противовирусном иммунном ответе. На уровне слизистых оболочек ротоглотки, IL2 может способствовать формированию эффективной Т-клеточной активности против SARS-CoV-2. Увеличенная продукция IL2 и IL3 в эпителиальных клетках ВДП на ранних стадиях COVID-19 может указывать на дифференцировку иммунных клеток, необходимых для эффективного противовирусного ответа [167].



Примечание: Красным цветом обозначена группа лиц со среднетяжелым течением COVID-19. Зеленым цветом обозначена группа условно здоровых лиц. \* $p < 0,05$  по методу Холм-Сидак

Рисунок 31 – Продукция цитокинов у лиц со среднетяжелым течением COVID-19 на уровне слизистых оболочек ротоглотки

Оценка продукции цитокинов в плазме крови у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19, показала увеличение продукции IL1ra, IL1 $\beta$  на системном уровне (Рисунок 32). Однако достоверных зависимостей найдено не было.



Примечание: Красным цветом обозначена группа лиц со среднетяжелым течением COVID-19. Зеленым цветом обозначена группа условно здоровых лиц

Рисунок 32 – Продукция цитокинов у лиц со среднетяжелым течением в плазме крови

Специфическая защита слизистых оболочек обеспечивается антителами, которые в человеческих выделениях относятся преимущественно к изотипу IgA. В ряде исследований существует зависимость между протеканием острой и хронической вирусной инфекцией и продукцией sIgA и IgA общего на уровне слизистых оболочек ВДП [106, 168]. В литературе много исследований показывают, что повышенные уровни sIgA и IgA общего наблюдаются при остром и хроническом течении инфекции, однако уровень специфичных к вирусу SARS- CoV-2 sIgA не обсуждается. В данной работе был исследован уровень специфичных sIgA у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 и у лиц, перенесших данную инфекцию. В работе получены следующие результаты (Рисунок 33, Рисунок 34).

На уровне слизистых оболочек ротовой полости наблюдается резкое увеличение уровня продукции sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 в первые сутки с момента заболевания с последующим снижением уровня продукции на 15-е и 30-е сутки (Рисунок 33). Исследования показали, что уровни sIgA в ротоглотке повышаются в течение нескольких дней после появления симптомов COVID-19. Такой рост продукции sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 может говорить об иммунном ответе слизистой оболочки организма на вирус [169].

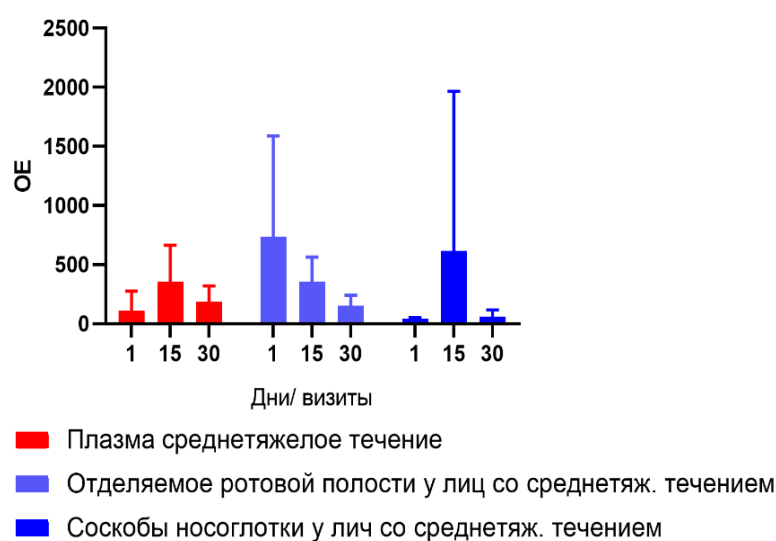


Рисунок 33 – Специфичные антитела sIgA к вирусу SARS -CoV-2 у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19

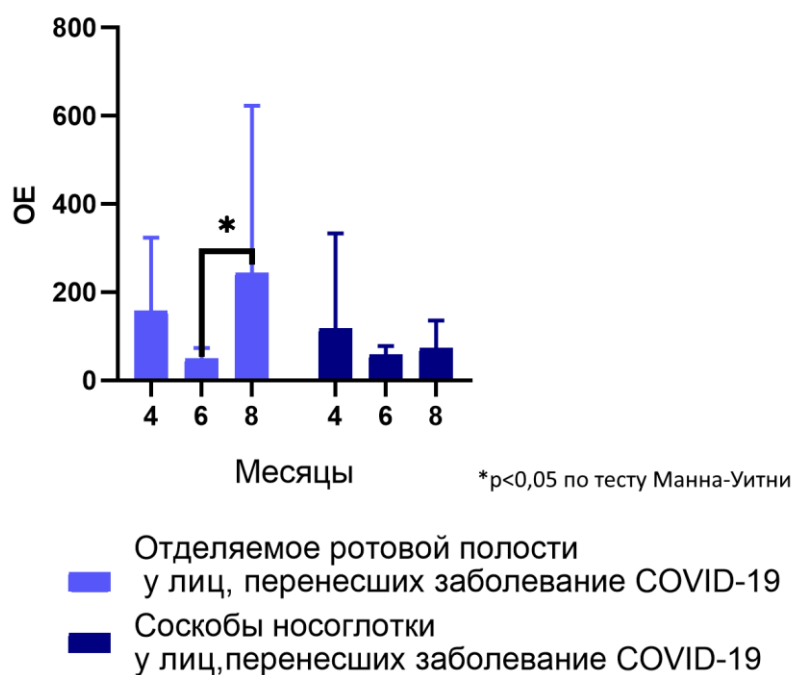


Рисунок 34 – Специфичные антитела sIgA к вирусу SARS-CoV-2 у лиц, перенесших заболевание COVID-19

У лиц, перенесших заболевание COVID-19, наблюдалась гиперпродукция специфичных sIgA к вирусу SARS-CoV-2 в ротовой полости относительно продукции данных антител в носоглотке. Достоверно увеличивался уровень продукции sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 в ротовой полости в 2,9 раз на 8 месяц после перенесенного заболевания COVID-19 относительно 6 месяца (Рисунок 34). На уровне слизистых оболочек носоглотки наблюдалось увеличение уровня продукции sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2, однако достоверных зависимостей не было обнаружено.

Такое разнонаправленное уровня продукции на уровне мукозальной иммунной системы можно объяснить тем, что анатомически слизистый эпителий ротоглотки и носоглотки относится к общей группе, именуемой NALT, они относятся к разному типу слизистых. Например, слизистая оболочка ротовой полости состоит из выстилающего эпителия, который выделяет секрет для элиминации патогенов. В то время как слизистая оболочка носоглотки состоит из реснитчатого эпителия и выполняет барьерную функцию между окружающей средой и поддержанием внутреннего гомеостаза. Благодаря врожденному и

адаптивному иммунитету, иммунная система слизистой оболочки поддерживает гомеостаз по обширному пространству поверхности эпителия, от полости рта и носа до дыхательных, кишечных и мочеполовых путей.

На системном уровне наблюдалось увеличение продукции специфичных sIgA у лиц со среднетяжелым течением новой коронавирусной инфекции в период снижения вирусной нагрузки (15-е сутки) и к моменту выздоровления снижался (30-тые сутки) (Рисунок 33). Известно, что sIgA имеет относительно короткий период полураспада по сравнению с другими классами антител, такими как IgG. Это означает, что он производится и разрушается быстрее, что может способствовать наблюдаемому снижению уровней в плазме с течением времени [170]. На локальном наблюдалась другая картина (Рисунок 34). На уровне слизистых оболочек носоглотки наблюдалась тенденция ( $p=0,059$ ) к увеличению продукции специфичных антител sIgA на 15-е сутки с момента заболевания и к моменту выздоровления значительно снижается в 5,6 раз. Стоит отметить, что исходно в период первых суток с момента заболевания уровень sIgA специфичных к вирусу был низким.

Можно заключить, что в целом уровень белковой продукции молекул адаптивного иммунитета увеличивается как на системном уровне, так и на уровне мукозальной иммунной системы. Увеличение белковой продукции на уровне мукозальной иммунной системы при COVID-19 свидетельствует об активации иммунного ответа на уровне слизистых оболочек, которые выступают в качестве первой линии защиты от вирусной инфекции. Такое повышение синтеза цитокинов и антител, может способствовать усилению защитных механизмов, направленных на фагоцитоз вирусных частиц и инфицированных клеток, а также на регуляцию воспалительных реакций. В результате, активизация мукозальной иммунной системы может играть важную роль в ограничении вирусной репликации и уменьшении тяжести заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была проведена оценка экспрессионного профиля молекул врожденного иммунитета на уровне мукозальной иммунной системы. Были получены данные о достоверном снижении, как некоторых факторов рецепторного аппарата врожденного иммунитета, так и эффекторных молекул на уровне слизистых оболочек ВДП у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19. Так, например, нами было выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии генов *TLR3*, *TLR7* в первые дни заболевания COVID-19, которые могут быть связаны с блокировкой сигнального пути патогеном. Однако, в то же время в первые сутки заболевания увеличивается экспрессия *IL1 $\beta$*  на уровне мукозального иммунитета и увеличивается экспрессия гена *IL28* на уровне входных ворот инфекции. Однако в дальнейшем экспрессия этих молекул снижается в период протекания заболевания, что может объясняться тем фактом что, в процессе вирусной нагрузки исчерпываются количественные ресурсы противовирусной защиты организма. Помимо этого, данные, полученные в работе, позволяют предположить об активации альтернативного пути каскадных реакций молекул врожденного иммунитета. Несмотря на стратегии уклонения вируса SARS-CoV-2 для инактивации противовирусного иммунитета, мукозальный иммунный ответ быстро реагирует на вирусную нагрузку, что может быть косвенно связано с тяжестью заболевания. В данной работе была представлена сравнительная характеристика экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП как у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19, так и у лиц, перенесших данную патологию. В результате этой сравнительной оценки было выявлено, что уровень экспрессии рецепторного аппарата молекул врожденного иммунитета сохраняется низким после перенесенного заболевания COVID-19, в то время как уровень экспрессии молекул противовирусного иммунного ответа сохраняется высоким на уровне входных ворот инфекции (слизистая оболочка носоглотки). Полученные данные совпадают с данными в литературе о сохранении высоких уровней

экспрессии молекул противовирусной защиты в течении полугода после перенесенного заболевания COVID-19. Данная разнонаправленная экспрессия рецепторов и молекул врожденного иммунитета может объяснять тяжелые «пост» ковидные состояния у пациентов. Если на локальном уровне происходит активация альтернативных путей передачи сигнала, происходит общее снижение экспрессии рецепторов врожденного иммунитета, то организм становится более восприимчив к инфекциям, а высокая активация противовирусного иммунитета, истощается в ходе протекания COVID-19, что и косвенно объясняет подверженность лиц, перенесших данную патологию к инвазии другими инфекционными агентами.

Следует отметить, что по нашим и литературным данным, происходила активация факторов адаптивного иммунитета. Например, было выявлено увеличение уровня продукции sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 в ротовой полости у лиц, перенесших заболевание COVID-19. Продукция цитокинов на уровне мукозальной иммунной системы, в частности на слизистых оболочках ротоглотки так же показала увеличение провоспалительных цитокинов IL2, IL3. Такое увеличение уровня продукции молекул адаптивного иммунитета и цитокинов на уровне мукозальной иммунной системы можно объяснить морфологическими особенностями слизистых оболочек ротоглотки и ротовой полости. Поскольку эпителиальные клетки ротовой полости и ротоглотки относятся к слизистым первого типа, то их функциональная особенность – секреция sIgA в ответ на действие патогенов.

Проведённая оценка ассоциации уровня экспрессии генов экспрессии рецепторов и молекул врожденного иммунитета показала сильную между *TLR7* и *IL1 $\beta$* , *TLR3* и *IL28* на уровне слизистой оболочки ротовой полости у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19. В группе лиц, перенесших заболевание COVID-19, сильная взаимосвязь наблюдалась между *IL28* и *TNF- $\alpha$*  на уровне слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки.

Таким образом, результаты данной работы позволяют расширить знания о молекулярных механизмах иммунного ответа на уровне слизистых оболочек в ответ на вирус SARS-CoV-2. Совокупность полученных данных позволяет

построить алгоритм (Рисунок 35), который показывает изменения в уровне экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП в контексте заболевания COVID-19. Полученные в ходе исследования данные могут быть применены в клинической практике для эффективного лечения, как среднетяжелого течения COVID-19, так и для эффективного реабилитационного процесса. Есть основания полагать, что исследование механизмов мукозального иммунитета позволит выявить мишени для таргетного терапевтического воздействия. В связи с этим важно иметь полное представление о патогенетических механизмах заболевания COVID-19.

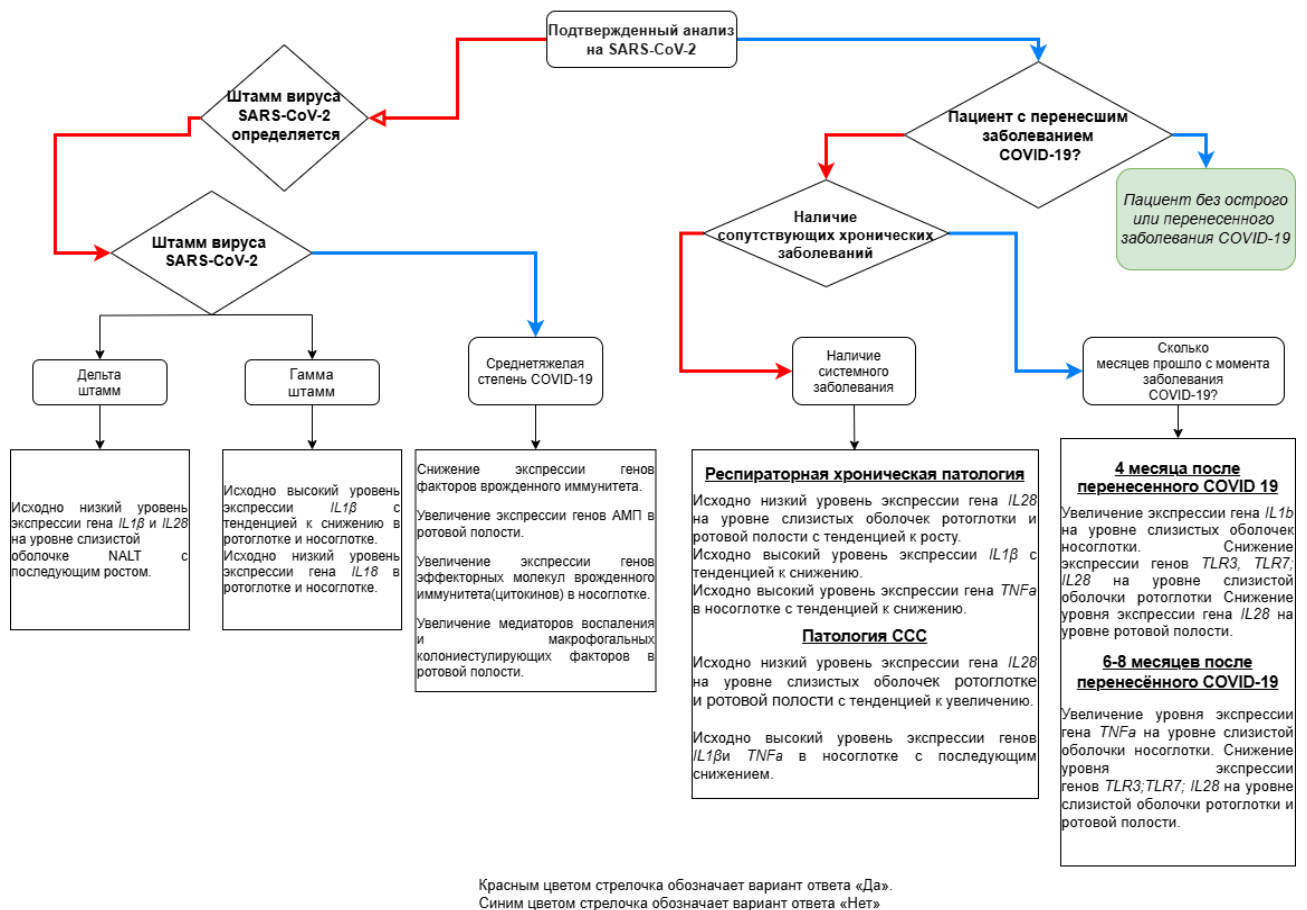


Рисунок 35 – Алгоритм изменения в уровне экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета

## ВЫВОДЫ

1. Установлено снижение экспрессии генов рецепторного аппарата врожденного иммунитета *TLR3* и *TLR7* в эпителиальных клетках носоглотки у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19. Снижался уровень экспрессии гена *TLR3* на уровне слизистых оболочек ротоглотки в  $1,3 \cdot 10^3$  раз,  $4,14 \cdot 10^5$  раз и в  $1,88 \cdot 10^5$  у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 в течении всего стационарного лечения, в то время как уровень экспрессии гена *TLR7* в ротоглотке снижался лишь в дебюте заболевания.

2. Экспрессия гена *HBD2* на уровне слизистой оболочки ротовой полости увеличивается в 73,7 раз на первый день лечения среднетяжелого течения COVID-19 относительно группы условно здоровых лиц.

3. Выявлена разнонаправленная экспрессия эффекторных молекул врожденного иммунитета. Выявлено увеличение уровней экспрессии гена *IL1 $\beta$*  и *TNF $\alpha$*  у лиц со среднетяжелым течением заболевания COVID-19 на уровне слизистого эпителия ВДП. Экспрессия гена *TNF $\alpha$*  увеличивалась на уровне носоглотки и на уровне слизистого эпителия ротовой полости в первые две недели среднетяжелого течения COVID-19. Экспрессия гена *IL1 $\beta$*  увеличивалась на уровне слизистых оболочек ротоглотки. Однако у лиц со среднетяжелым течением COVID-19 снижался уровень экспрессии *IL18*, *IL28* на уровне слизистых оболочек ВДП.

4. Установлено достоверное снижение уровня экспрессии гена *TLR3* и *TLR7* в течении полугода, после перенесенного заболевания COVID-19 на уровне слизистых оболочек ротоглотки.

5. Показано увеличение уровня экспрессии генов *IL1 $\beta$* , *TNF $\alpha$*  на уровне слизистой оболочки носоглотки в течении всего реабилитационного процесса. Однако снижался уровень экспрессии гена *IL28* на уровне слизистой оболочки ротоглотки и ротовой полости в течении 4,6,8 месяцев после перенесенного заболевания COVID-19.

6. При оценке цитокинового профиля было выявлено достоверное увеличение уровня продукции цитокинов IL2, IL3 в 1,8 и 1,6 раз соответственно на уровне слизистых оболочках ротоглотки в дебюте заболевания COVID-19.

7. Увеличивалась в 2,9 раз продукция sIgA специфичных к вирусу SARS-CoV-2 в ротовой полости у лиц, перенесших заболевание COVID-19 на 8 месяц относительно полугода с момента заболевания COVID-19.

8. Проведение корреляционного анализа экспрессии генов молекул врождённого иммунитета и цитокинов на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей выявило следующее: у лиц со среднетяжелым течением заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2 была выявлена сильная взаимосвязь между *TLR7* и *IL1 $\beta$*  ( $r=0,4026$ ) на уровне слизистой оболочки ротовой полости, в то время как в группе лиц перенесших заболевание COVID-19 сильная взаимосвязь наблюдалась между *IL28* и *TNF $\alpha$*  ( $r=0,693$ ) на уровне слизистых оболочек ротоглотки. На уровне слизистого эпителия ротовой полости сильная взаимосвязь наблюдалась между *TLR3* и *TNF $\alpha$*  ( $r=0,432$ )

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Новые закономерности, выявленные в данной работе, будут способствовать разработке более эффективной таргетной терапии, которая будет стимулировать иммунный ответ не только в системном, но и в местном (мукозальном) уровнях. Это важно для защиты дыхательных путей, которые являются входными воротами для вируса.

2. Результаты исследования могут использоваться для разработки эффективной поддерживающей иммунной терапии, при котором уровень мукозального иммунитета будет учитываться, что позволит улучшить исходы для различных групп пациентов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АМП – антимикробный пептид
- АПК – антиген-презентирующих клеток
- АПФ – ангиотензинпревращающий фермент
- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- ВДП – верхние дыхательные пути
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИФН – интерфероны
- оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ССС – сердечно сосудистая система
- AIM2 (absent in melanoma 2)-подобные рецепторы – отсутствующие в меланоме 2-подобные рецепторы
- BALT – бронхоассоциированная лимфоидная ткань
- CBAD – активатор фактора транскрипции C/EBP $\beta$
- CMIS – общая иммунная система слизистой оболочки
- COVID-19 (CoronaVirus Disease 2019) – коронавирусная болезнь 2019 года
- DAMP (Damage-associated molecular patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением; эндогенные лиганды
- FCS – сайт расщепления многоосновного фурина (Furin Cleavage Site)
- GALT – кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань
- HBD – human  $\beta$ -defensin
- HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (Human Leukocyte Antigen)
- HPS – белок теплового шока
- Ig – иммуноглобулин
- IL – интерлейкины
- IRAK – IL-1R-ассоциированная киназа
- IRF – регуляторный фактор интерферонов (Interferon Regulatory Factor)

JAK –Janus kinase

LRR – лейцин богатые повторы

MALT – мукоза ассоциированная лимфоидная ткань

MAPK – mitogen activated kinase-like protein

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа

MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) – белок, ассоциированный с дифференцировкой меланомы

MHC – молекулы главного комплекса гистосовместимости

MyD88 – миелоидный фактор дифференциации 88

NEMO – NF-κB–Ядерный модулятор

NF-κB – ядерный фактор-κB

NK – естественные киллеры

NLR – NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptor)

NOD – нуклеотидные олигомеризующиеся домены

NTD –N-концевой домен (N-terminal domain,)

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PRR – паттерн-распознающие рецепторы

RBD –домен связывания рецептора (Receptor-binding domain,)

RLR – RIG-I-подобные рецепторы (RIG-I-like receptor)

SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) – второй коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома

TCR – T-клеточный рецептор

Th – T helper

TIR – Toll/интерлейкин-1 рецептор

TLR – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptor)

TNF – фактор некроза опухоли

TRIF – TIR-доменсодержащий адаптер-индуцирующий интерферон-β

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Timeline of WHO's response to COVID-19 : офиц. сайт. Обновляется в течение недели. - URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline> (дата обращения: 21.06.2023).
2. Diamond, M. S. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2 / M. S. Diamond, T.-D. Kanneganti // *Nature Immunology*. – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 165-176.
3. Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus / W. G. Carlos, C. S. Dela Cruz, B. Cao [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2020. – Vol. 201. – № 4. – P. P7-P8.
4. Coronavirus Disease 19 (COVID-19): Implications for Clinical Dental Care / A. Ather, B. Patel, N. B. Ruparel [et al.] // *Journal of Endodontics*. – 2020. – Vol. 46. – Coronavirus Disease 19 (COVID-19). – № 5. – P. 584-595.
5. Expression of ACE2, the SARS-CoV-2 Receptor, and TMPRSS2 in Prostate Epithelial Cells / H. Song, B. Seddighzadeh, M. R. Cooperberg, [et al.] // *European Urology*. – 2020. – Vol. 78. – № 2. – P. 296.
6. Russell, M. W. Mucosal immunity: The missing link in comprehending SARS-CoV-2 infection and transmission / M. W. Russell, J. Mestecky // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – Mucosal immunity. – P. 957107.
7. Brandtzaeg, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions / P. Brandtzaeg // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 70. – Mucosal immunity. – № 6. – P. 505-515.
8. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection / M. W. Russell, Z. Moldoveanu, P. L. Ogra, [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – Mucosal Immunity in COVID-19. – P. 611337.
9. Çelik, İ. Emerging and reemerging respiratory viral infections up to Covid-19 / İ. Çelik, E. Saatçi, A. Eyüboğlu // *Turkish Journal of Medical Sciences*. – 2020. – Vol. 50. – № 9. – С. 557-562.

10. Christopher J.L. Murray, M.D., D.Phil., Measuring the Global Burden of Disease | New England Journal of Medicine: Открытый источник. – URL: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1201534> (дата обращения: 08.11.2024). – Текст : электронный.
11. Viral Respiratory Pathogens and Lung Injury / N. Clementi, S. Ghosh, M. De Santis [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2021. – Vol. 34. – № 3. – P. e00103-20.
12. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges / C.-C. Lai, T.-P. Shih, W.-C. Ko [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. – Vol. 55. – Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19). – № 3. – P. 105924.
13. Cui, J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, Z.-L. Shi // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – Vol. 17. – № 3. – P. 181-192.
14. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 / N. Zhu, D. Zhang, W. Wang [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – № 8. – P. 727-733.
15. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster / J. F.-W. Chan, S. Yuan, K.-H. Kok [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – № 10223. – P. 514-523.
16. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins / K. Xiao, J. Zhai, Y. Feng [et al.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 583. – № 7815. – P. 286-289.
17. Middle East respiratory syndrome coronavirus: transmission, virology and therapeutic targeting to aid in outbreak control / P. Durai, M. Batool, M. Shah, S. Choi // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2015. – Vol. 47. – № 8. – P. e181-e181.
18. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard: офиц. сайт. WHO. Обновляется в течение недели - URL: <https://www.who.int/publications/i/item/clinical-care-of-severe-acute-respiratory-infections-tool-kit> (дата обращения: 25.09.2024)
19. Worldometer: офиц. сайт. Обновляется в течение недели - URL: <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries> (дата обращения: 04.12.2023).

20. WHO Coronavirus (COVID-19) : офиц. сайт. WHO press conference on COVID-19 and other global health issues - 5 May 2023. – URL: <https://www.who.int/multi-media/details/who-press-conference-on-covid-19-and-other-global-health-issues---5-may-2023> ((дата обращения: 07.05.2023)). – Text : electronic.
21. Imran, M. SARS-CoV2 Outbreak: Emergence, transmission and clinical features of human coronaviruses / M. Imran, R. Yasmeen // Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC. – 2020. – Vol. 32(Suppl 1). – SARS-CoV2 Outbreak. – № 4. – P. S710-S713.
22. Sharma, A. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention / A. Sharma, I. Ahmad Farouk, S. K. Lal // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – COVID-19. – № 2. – P. 202.
23. Sawicki, S. G. A contemporary view of coronavirus transcription / S. G. Sawicki, D. L. Sawicki, S. G. Siddell // Journal of Virology. – 2007. – Vol. 81. – № 1. – P. 20-29.
24. Шилин, Д. С. Влияние маневра прон-позиции на состояние гемодинамического и респираторного статуса у пациентов с тяжелыми формами COVID-19: специальность: 3.1.12. Анестезиология и реаниматология : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Шилин Дмитрий Сергеевич; Федеральное Государственное Бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская Государственная Медицинская Академия» министерства здравоохранения российской федерации. –Чита, 2024 134 с.
25. Evolutionary insights into the furin cleavage sites of SARS-CoV-2 variants from humans and animals / A. Nagy, S. Basiouni, R. Parvin [et al.] // Archives of Virology. – 2021. – Vol. 166. – № 9. – P. 2541-2549.
26. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness / A. M. Carabelli, T. P. Peacock, L. G. Thorne [et al.] // Nature Reviews Microbiology. – 2023. – Vol. 21. – № 3. – P. 162-177.
27. Мохов, А. С. Эпидемиологические особенности тяжелых форм COVID-19: специальность: 3.2.2. «Эпидемиология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Мохов Алексей Сергеевич; Северо-

Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова.– Санкт-Петербург – 2022. –23 с.

28. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis / M. Mohamadian, H. Chiti, A. Shoghli [et al.] // *The Journal of Gene Medicine*. – 2021. – Vol. 23. – COVID-19. – № 2. – P. e3303.

29. Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review / R. Carrasco-Hernandez, R. Jácome, Y. López Vidal, S. Ponce de León // *ILAR Journal*. – 2017. – Vol. 58. – Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? – № 3. – P. 343-358.

30. Key Factors That Enable the Pandemic Potential of RNA Viruses and Inter-Species Transmission: A Systematic Review / S. Alvarez-Munoz, N. Upegui-Porras, A. P. Gomez, G. Ramirez-Nieto // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 4.

31. Investigation of SARS-CoV-2 variants of concern: technical briefings. – URL: <https://www.gov.uk/government/publications/investigation-of-novel-sars-cov-2-variant-variant-of-concern-20201201> (date accessed: 08.11.2024). – Text : electronic.

32. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa / H. Tegally, E. Wilkinson, M. Giovanetti [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 592. – № 7854. – P. 438-443.

33. Choi, J. Y. SARS-CoV-2 Variants of Concern / J. Y. Choi, D. M. Smith // *Yonsei Medical Journal*. – 2021. – Vol. 62. – № 11. – P. 961-968.

34. Spira, B. The Impact of the Highly Virulent SARS-CoV-2 Gamma Variant on Young Adults in the State of São Paulo: Was It Inevitable? / B. Spira // *Cureus*. – 2022. – Vol. 14. – The Impact of the Highly Virulent SARS-CoV-2 Gamma Variant on Young Adults in the State of São Paulo. – № 7. – P. e26486.

35. Impact of SARS-CoV-2 Gamma lineage introduction and COVID-19 vaccination on the epidemiological landscape of a Brazilian city / C. A. Banho, L. Sacchetto, G. R. F. Campos [et al.] // *Communications Medicine*. – 2022. – Vol. 2. – № 1. – P. 41.

36. CDC COVID Data Tracker. США, Druid Hills, штат Джорджия. Данные в коммуникативных форматах html - URL: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker> (дата обращения: 24.07.2024). Режим доступа: открытый доступ.

37. From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants / V. Papanikolaou, A. Chrysovergis, V. Ragos [et al.] // *Gene*. – 2022. – Vol. 814. – From delta to Omicron. – P. 146134.
38. Girma, A. The Many Mutations of the COVID-19 Variant: Current Perspectives on EG.5/Eris / A. Girma // *Environmental Health Insights*. – 2023. – Vol. 17. – The Many Mutations of the COVID-19 Variant. – P. 11786302231217805.
39. An overview of viral mutagenesis and the impact on pathogenesis of SARS-CoV-2 variants / M. Z. I. Khan, A. Nazli, H. Al-furas [et al.]. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.1034444/full> (дата обращения: 08.11.2024).
40. Majumder, J. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19 / J. Majumder, T. Minko // *The AAPS journal*. – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 14.
41. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management / R. Ochani, A. Asad, F. Yasmin [et al.] // *Le Infezioni in Medicina*. – 2021. – Vol. 29. – COVID-19 pandemic. – № 1. – P. 20-36.
42. Potential neurological manifestations of COVID-19: a narrative review / J. V. Pergolizzi, R. B. Raffa, G. Varrassi [et al.] // *Postgraduate Medicine*. – 2022. – Vol. 134. – Potential neurological manifestations of COVID-19. – № 4. – P. 395-405.
43. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression / P. Mehta, D. F. McAuley, M. Brown [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – № 10229. – P. 1033-1034.
44. Immune response to SARS-CoV-2 variants: A focus on severity, susceptibility, and preexisting immunity / E. Alefishat, H. F. Jelinek, M. Mousa [et al.] // *Journal of Infection and Public Health*. – 2022. – Vol. 15. – Immune response to SARS-CoV-2 variants. – № 2. – P. 277-288.

45. Penetrability of the inner mucus layer: who is out there? / H. Li, J. P. Limenitakis, S. C. Ganal, A. J. Macpherson // *EMBO Reports*. – 2015. – Vol. 16. – Penetrability of the inner mucus layer. – № 2. – P. 127.
46. Экспрессия рецепторов врожденного иммунитета TLR3 и TLR7 на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Н.Д. Абрамова, Т.Д. Сощенко, Е.А. Меремьянина, [и др.]//–*Терапия*. – 2023. –Т.9. –№2.– С.7–13.
47. Ярилин, А. А. Клеточные основы мукозального иммунитета / А. А. Ярилин // *Российский Иммунологический Журнал*. – 2008. – Т. 2. – № 1 (11). – С. 3-19.
48. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия/ Козлов И.Г.//*Российский Медицинский Журнал*. – 2018. – Т. 8.– №1.– С. 19-27.
49. Мукозальный иммунитет респираторного тракта и его роль при профессиональных патологиях / Хаитов М.Р., Ильина Н.И, Лусс. Л.В, Бабахин. А.А // *Медицина экстремальных ситуаций*. – 2017. – № 3 (61). – С. 8-24.
50. J Mestecky. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions - PubMed. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3301884/> (дата обращения: 08.11.2024). – Текст : электронный.
51. Intestinal Host Response to SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Outcomes in Patients With Gastrointestinal Symptoms / A. E. Livanos, D. Jha, F. Cossarini [et al.] // *Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 160. – № 7. – P. 2435-2450.e34.
52. Upper respiratory tract mucosal immunity for SARS-CoV-2 vaccines / R. Fraser, A. Orta-Resendiz, A. Mazein, [et al.] // *Trends in Molecular Medicine*. – 2023. – Vol. 29. – № 4. – P. 255-267.
53. Экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-18, IL-33) на уровне слизистой оболочки входных ворот инфекции у лиц, перенесших заболевание COVID-19 / Н. Д. Рассказова, Н. Д. Абрамова, Т. Д. Сощенко [и др.] // *Инфекция И Иммунитет*. – 2024. – Т. 14. – № 3. – С. 423-428.

54. Мукозальный иммунитет: активация агонистами Toll-подобных рецепторов / Э. А. Ахматов, А. Н. Кимовна, Н. Б. Егорова [и др.]. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9. – № 1(18). – С.71-82.
55. Khanmohammadi, S. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19 / S. Khanmohammadi, N. Rezaei // Journal of Medical Virology. – 2021. – Vol. 93. – № 5. – P. 2735-2739.
56. Matsumoto, M. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway / M. Matsumoto, H. Oshiumi, T. Seya // Reviews in Medical Virology. – 2011. – Vol. 21. – № 2. – P. 67-77.
57. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses / Y. Chen, J. Lin, Y. Zhao [et al.] // Journal of Zhejiang University. Science. B. – 2021. – Vol. 22. – № 8. – P. 609-632.
58. Uehata, T. RNA Recognition and Immunity-Innate Immune Sensing and Its Posttranscriptional Regulation Mechanisms / T. Uehata, O. Takeuchi // Cells. – 2020. – Vol. 9. – № 7. – P. 1701.
59. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3 / L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell // Nature. – 2001. – Vol. 413. – № 6857. – P. 732-738.
60. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex / I. Botos, L. Liu, Y. Wang [et al.] // Biochimica Et Biophysica Acta. – 2009. – Vol. 1789. – The toll-like receptor 3. – № 9-10. – P. 667-674.
61. Tumoural activation of TLR3–SLIT2 axis in endothelium drives metastasis / B. Tavora, T. Mederer, K. J. Wessel [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 586. – № 7828. – P. 299-304.
62. Comparative Geometrical Analysis of Leucine-Rich Repeat Structures in the Nod-Like and Toll-Like Receptors in Vertebrate Innate Immunity / N. Matsushima, H. Miyashita, P. Enkhbayar, R. H. Kretsinger // Biomolecules. – 2015. – Vol. 5. – № 3. – P. 1955-1978.

63. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA / Z. Zhang, U. Ohto, T. Shibata [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 45. – № 4. – P. 737-748.
64. Piras, V. Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling / V. Piras, K. Selvarajoo // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 70.
65. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling / K. Honda, H. Yanai, T. Mizutani [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 43. – P. 15416-15421.
66. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling / M. M. Brinkmann, E. Spooner, K. Hoebe [et al.] // *The Journal of Cell Biology*. – 2007. – Vol. 177. – № 2. – P. 265-275.
67. Biochemical and functional analyses of the human Toll-like receptor 3 ectodomain / C. T. Ranjith-Kumar, W. Miller, J. Xiong [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 10. – P. 7668-7678.
68. Barton, G. M. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA / G. M. Barton, J. C. Kagan, R. Medzhitov // *Nature Immunology*. – 2006. – Vol. 7. – № 1. – P. 49-56.
69. Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling / L. C. Plataniias // *Nature Reviews Immunology*. – 2005. – Vol. 5. – № 5. – P. 375-386.
70. Reikine, S. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5 / S. Reikine, J. B. Nguyen, Y. Modis // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 342.
71. Allie, S. R. Pulmonary immunity to viruses / S. R. Allie, T. D. Randall // *Clinical Science (London, England: 1979)*. – 2017. – Vol. 131. – № 14. – P. 1737-1762.
72. Haller, O. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses / O. Haller, G. Kochs, F. Weber // *Virology*. – 2006. – Vol. 344. – The interferon response circuit. – № 1. – P. 119-130.
73. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action / M. A. García, J. Gil, I. Ventoso [et al.] // *Microbiology and molecular biology*

reviews: MMBR. – 2006. – Vol. 70. – Impact of protein kinase PKR in cell biology. – № 4. – P. 1032-1060.

74. IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex / S. V. Kotenko, G. Gallagher, V. V. Baurin [et al.] // Nature Immunology. – 2003. – Vol. 4. – № 1. – P. 69-77.

75. Malmgaard, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections / L. Malmgaard // Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research. – 2004. – Vol. 24. – № 8. – P. 439-454.

76. Katze, M. G. Viruses and interferon: a fight for supremacy / M. G. Katze, Y. He, M. Gale // Nature Reviews Immunology. – 2002. – Vol. 2. – № 9. – P. 675-687.

77. Интерфероны лямбда – возможности терапевтического применения / Н. А. Кихтенко, Л. А. Олейник, В. К. Макаров [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – Т. 40. – № 2. – С. 15-23.

78. Acharya, D. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19 / D. Acharya, G. Liu, M. U. Gack // Nature Reviews Immunology. – 2020. – Vol. 20. – № 7. – P. 397-398.

79. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response / M. Sa Ribero, N. Jouvenet, M. Dreux, [et al.] // PLoS pathogens. – 2020. – Vol. 16. – № 7. – P. e1008737.

80. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19 / D. Blanco-Melo, B. E. Nilsson-Payant, W.-C. Liu [et al.] // Cell. – 2020. – Vol. 181. – № 5. – P. 1036-1045.e9.

81. The role of IL-1 family of cytokines and receptors in pathogenesis of COVID-19 / S. Makaremi, A. Asgarzadeh, H. Kianfar [et al.] // Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society. – 2022. – Vol. 71. – № 7-8. – P. 923-947.

82. Prospective Roles of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) in COVID-19: Prognosis, Therapeutic and Management / Z. Mohd Zawawi, J. Kalyanasundram [et al.]

// International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Prospective Roles of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) in COVID-19. – № 7. – P. 6142.

83. Distinct SARS-CoV-2 specific NLRP3 and IL-1 $\beta$  responses in T cells of aging patients during acute COVID-19 infection / S. S. Mahalingam, S. Jayaraman, A. Arunkumar [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1231087.

84. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19 / L. Yang, X. Xie, Z. Tu [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 255.

85. Cytokine Storm in COVID-19-Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper / S. Bhaskar, A. Sinha, M. Banach [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – T. 11. – Cytokine Storm in COVID-19-Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches. – C. 1648.

86. Airway epithelium expresses interleukin-18 / L. A. Cameron, R. A. Taha, A. Tsicopoulos [et al.] // *The European Respiratory Journal*. – 1999. – Vol. 14. – № 3. – P. 553-559.

87. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment / S. A. Ihim, S. D. Abubakar, Z. Zian [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity. – P. 919973.

88. Schooling, C. M. Interleukin-18 and COVID-19 / C. M. Schooling, M. Li, S. L. Au Yeung // *Epidemiology and Infection*. – 2021. – Vol. 150. – P. e14.

89. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19 / H. Satış, H. S. Özger, P. A. Yıldız [et al.] // *Cytokine*. – 2020. – Vol. 137. – P. 155302.

90. Targeting TNF- $\alpha$  for COVID-19: Recent Advanced and Controversies / Y. Guo, K. Hu, Y. Li [et al.] // *Frontiers in Public Health*. – 2022. – Vol. 10. – Targeting TNF- $\alpha$  for COVID-19. – P. 833967.

91. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19 / J. S. Kim, J. Y. Lee, J. W. Yang [et al.] // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 316-329.

92. Mahlapuu, M. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges / M. Mahlapuu, C. Björn, J. Ekblom // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2020. – Vol. 40. – Antimicrobial peptides as therapeutic agents. – № 7. – P. 978-992.
93. Wang, G. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education / G. Wang, X. Li, Z. Wang // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – APD3. – № D1. – P. D1087-1093.
94. Абрамова, Н. Д. Экспрессия и продукция антимикробных пептидов у лиц с тяжелым течением заболевания, вызванного *SARS-CoV-2* / Н. Д. Абрамова, Е. А. Меремьянина (Семенова), О. А. Свитич (Ганковская) // *Медицинский Вестник Мвд*. – 2023. – Т. 127. – № 6 (127). – С. 69-73.
95. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense / G. Diamond, N. Beckloff, A. Weinberg, K. O. Kisich // *Current Pharmaceutical Design*. – 2009. – Vol. 15. – № 21. – P. 2377-2392.
96. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields / A. Moretta, C. Scieuzo, A. M. Petrone [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – Antimicrobial Peptides. – P. 668632.
97. WuDunn, D. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate / D. WuDunn, P. G. Spear // *Journal of Virology*. – 1989. – Vol. 63. – № 1. – P. 52-58.
98. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E. W. Hancock // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2006. – Vol. 19. – № 3. – P. 491-511.
99. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense / G. Diamond, N. Beckloff, A. Weinberg, K. O. Kisich // *Current Pharmaceutical Design*. – 2009. – Vol. 15. – № 21. – P. 2377-2392.
100. Molecular dynamics simulations and functional studies reveal that hBD-2 binds SARS-CoV-2 spike RBD and blocks viral entry into ACE2 expressing cells / L. Zhang, S. K. Ghosh, S. C. Basavarajappa [et al.] // *bioRxiv*. – 2021. – P. 2021.01.07.425621.
101. Fecal Human  $\beta$ -Defensin 2 in Children with Cystic Fibrosis: Is There a Diminished Intestinal Innate Immune Response? / C. Y. Ooi, T. Pang, S. T. Leach [et al.] // *Digestive*

Diseases and Sciences. – 2015. – Vol. 60. – Fecal Human  $\beta$ -Defensin 2 in Children with Cystic Fibrosis. – № 10. – P. 2946-2952.

102. Human  $\beta$ -defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity / J. Kim, Y. L. Yang, S.-H. Jang, Y.-S. Jang // *Virology Journal*. – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 124.

103. Ghorbani, M. Critical Sequence Hotspots for Binding of Novel Coronavirus to Angiotensin Converter Enzyme as Evaluated by Molecular Simulations / M. Ghorbani, B. R. Brooks, J. B. Klauda // *The Journal of Physical Chemistry. B*. – 2020. – Vol. 124. – № 45. – P. 10034-10047.

104. Mucosal immunity in health care workers' respiratory tracts in the post-COVID-19 period / N. Kryukova, I. Baranova, N. Abramova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 7162.

105. Secretory IgA and Course of COVID-19 in Patients Receiving a Bacteria-Based Immunostimulant Agent in Addition to Background Therapy/ Kostinov M., Svitich O., Chuchalin A., Abramova N. [et al.]// *Journal of Clinical and Cellular Immunology*–2023 –Vol. 14.– №1000682.– P.682-693

106. Secretory IgA and course of COVID-19 in patients receiving a bacteria-based immunostimulant agent in addition to background therapy / M. Kostinov, O. Svitich, A. Chuchalin, N. Abramova, [et al.] // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 11101.

107. Intestinal Host Response to SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Outcomes in Patients With Gastrointestinal Symptoms / A. E. Livanos, D. Jha, F. Cossarini [et al.] // *Gastroenterology*. – 2021. – Vol. 160. – № 7. – P. 2435-2450.e34.

108. An improvement of the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis / X. Rao, X. Huang, Z. Zhou, X. Lin // *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*. – 2013. – Vol. 3. – № 3. – P. 71-85.

109. Кулаичев А. П. Методы и средства комплексного анализа данных: Учебное пособие. — 4-е издание, переработанное и дополненное. / Кулаичев А. П. — 4 е издание, дополненное и переработанное. — Форум — Инфра-М, 2017 — 512 с. — ISBN - 978-5-16-104593-0 —Текст: непосредственный

110. Pilapitiya, D. Mucosal vaccines for SARS-CoV-2: triumph of hope over experience / D. Pilapitiya, A. K. Wheatley, H.-X. Tan // *EBioMedicine*. – 2023. – Vol. 92. – Mucosal vaccines for SARS-CoV-2. – P. 104585.
111. Holmgren, J. Mucosal immunity and vaccines / J. Holmgren, C. Czerkinsky // *Nature Medicine*. – 2005. – Vol. 11. – № 4. – P. S45-S53.
112. Koenderman, L. The innate immune response / L. Koenderman, W. Buurman, M. R. Daha // *Immunology Letters*. – 2014. – Vol. 162. – № 2 Pt B. – P. 95-102.
113. Ji, S. Innate immune response to oral bacteria and the immune evasive characteristics of periodontal pathogens / S. Ji, Y. Choi // *Journal of Periodontal & Implant Science*. – 2013. – Vol. 43. – № 1. – P. 3-11.
114. Elson, C. O. Host-microbiota interactions in the intestine / C. O. Elson, K. L. Alexander // *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*. – 2015. – Vol. 33. – № 2. – P. 131-136.
115. Diversity and Biogeography of Human Oral Saliva Microbial Communities Revealed by the Earth Microbiome Project / J. Wang, J. Feng, Y. Zhu [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 931065.
116. Longitudinal profiling of the microbiome at four body sites reveals core stability and individualized dynamics during health and disease / X. Zhou, X. Shen, J. S. Johnson [и др.] // *Cell Host & Microbe*. – 2024. – Vol. 32. – № 4. – P. 506-526.e9.
117. Ганковский, В. А. Значение врожденного иммунитета слизистой оболочки полости носа у больных с гипертрофией аденоидных вегетаций : специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Ганковский Виктор Анатольевич; Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации – Москва – 2013. – С. 105.
118. Immunobiology 5: the immune system in health and disease. Immunobiology 5 / ed. C. Janeway. – 5th ed. – New York : Garland Pub, 2001. – 1 p. – Текст : непосредственный

119. Menstrual cycle influences Toll-like receptor responses / U. Dennison, D. P. McKernan, P. Scully [et al.] // *Neuroimmunomodulation*. – 2012. – Vol. 19. – № 3. – P. 171-179.
120. Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine / D. Hartl, R. Tirouvanziam, J. Laval [et al.] // *Journal of Innate Immunity*. – 2018. – Vol. 10. – Innate Immunity of the Lung. – № 5-6. – P. 487-501.
121. Афанасьев, В. Ю. Гистология, эмбриология, цитология учебник / В. Ю. Афанасьев, Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. – 5-е перераб. и доп. – Москва : М.Медицина-Медиа, 2002. – 737 с.–ISBN 5-225-04523-5 – Текст : непосредственный
122. Pott, J. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease / J. Pott, M. Hornef // *EMBO reports*. – 2012. – Vol. 13. – № 8. – P. 684-698.
123. Lee, N. Differential Expression Patterns of Toll-like Receptors in COVID-19 Patients / N. Lee, R. Ko, S. Y. Lee // *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. – 2023. – Vol. 28. – № 11. – P. 307.
124. SARS-CoV-2 ORF9b antagonizes type I and III interferons by targeting multiple components of the RIG-I/MDA-5-MAVS, TLR3-TRIF, and cGAS-STING signaling pathways / L. Han, M.-W. Zhuang, J. Deng [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93. – № 9. – P. 5376-5389.
125. Lower peripheral blood Toll-like receptor 3 expression is associated with an unfavorable outcome in severe COVID-19 patients / M. C. S. Menezes, A. D. M. Veiga, T. Martins de Lima [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 15223.
126. Alterations in the Expression of IFN Lambda, IFN Gamma and Toll-like Receptors in Severe COVID-19 Patients / L. Sorrentino, M. Fracella, F. Frasca [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 3.
127. Sex-biased expression of the TLR7 gene in severe COVID-19 patients: Insights from transcriptomics and epigenomics / A. Gómez-Carballa, J. Pardo-Seco, S. Pischedda [et al.] // *Environmental Research*. – 2022. – Vol. 215. – Sex-biased expression of the TLR7 gene in severe COVID-19 patients. – № Pt 2. – P. 114288.

128. Genetic Screening for TLR7 Variants in Young and Previously Healthy Men with Severe COVID-19 / X. Solanich, G. Vargas-Parra, C. I. van der Made [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 719115.
129. Экспрессия и продукция цитокинов у пациентов с тяжелым течением SARS-CoV-2 / Н. Д. Абрамова, Е. А. Меремьянина (Семенова), Н. О. Калюжная [и др.] // *Российский Иммунологический Журнал*. – 2023. – Т. 26. – № 4. – С. 603-610.
130. Hirano, T. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome / T. Hirano, M. Murakami // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52. – COVID-19. – № 5. – P. 731-733.
131. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness / O. J. McElvaney, N. L. McEvoy, O. F. McElvaney [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2020. – Vol. 202. – № 6. – P. 812-821.
132. Differential expression of biomarkers in saliva related to SARS-CoV-2 infection in patients with mild, moderate and severe COVID-19 / L. Verdiguél-Fernández, R. Arredondo-Hernández, J. A. Mejía-Estrada [et al.] // *BMC infectious diseases*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 602.
133. Host-Microbiome Associations in Saliva Predict COVID-19 Severity / H. Alqedari, K. Altabtbaei, J. L. Espinoza [et al.] // *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*. – 2023. – P. 2023.05.02.539155.
134. Heterogeneous NLRP3 inflammasome signature in circulating myeloid cells as a biomarker of COVID-19 severity / J. Courjon, O. Dufies, A. Robert [et al.] // *Blood Advances*. – 2021. – Vol. 5. – № 5. – P. 1523-1534.
135. Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody / T. Kunikata, K. Torigoe, S. Ushio [et al.] // *Cellular Immunology*. – 1998. – Vol. 189. – № 2. – P. 135-143.
136. Биологическая активность интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19 / Т. П. Оспельникова (Трофимова), Д. С. Левицкая (Сулейманова), Л. В. Колодяжная [и др.] // *Вопросы Вирусологии*. – 2022. – Т. 67. – № 2. – С. 142-152.

137. Evaluation of the Anti-Viral Activity of Human Recombinant Interferon Lambda-1 against SARS-CoV-2 / P. G. Madonov, V. A. Svyatchenko, S. S. Legostaev [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 172. – № 1. – P. 53-56.
138. SARS-CoV-2 Infection Prompts IL-1 $\beta$ -Mediated Inflammation and Reduces IFN- $\lambda$  Expression in Human Lung Tissue / B. Vezzani, M. Neri, S. D'Errico [et al.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 11. – № 11. – P. 1390.
139. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19 / B. Sposito, A. Broggi, L. Pandolfi [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – № 19. – P. 4953-4968.e16.
140. Ye, Q. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 / Q. Ye, B. Wang, J. Mao // *The Journal of Infection*. – 2020. – Vol. 80. – № 6. – P. 607-613.
141. Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells Are Highly Activated and Functionally Impaired in COVID-19 Patients / S. Deschler, J. Kager, J. Erber [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 241.
142. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies / Y. Kasuga, B. Zhu, K.-J. Jang, J.-S. Yoo // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 53. – № 5. – P. 723-736.
143. SARS-CoV-2 NSP7 inhibits type I and III IFN production by targeting the RIG-I/MDA5, TRIF, and STING signaling pathways / J. Deng, Y. Zheng, S.-N. Zheng [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2023. – Vol. 95. – № 3. – P. e28561.
144. Traxinger, B. R. Mucosal tissue regulatory T cells are integral in balancing immunity and tolerance at portals of antigen entry / B. R. Traxinger, L. E. Richert-Spuhler, J. M. Lund // *Mucosal Immunology*. – 2022. – Vol. 15. – № 3. – P. 398-407.
145. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? / R. Bent, L. Moll, S. Grabbe, M. Bros // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 8. – P. 2155.
146. HBD-2 binds SARS-CoV-2 RBD and blocks viral entry: Strategy to combat COVID-19 / L. Zhang, S. K. Ghosh, S. C. Basavarajappa [et al.] // *iScience*. – 2022. – Vol. 25. – HBD-2 binds SARS-CoV-2 RBD and blocks viral entry. – № 3. – P. 103856.

147. Yüce, M. COVID-19 diagnosis -A review of current methods / M. Yüce, E. Filiztekin, K. G. Özkaya // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2021. – Vol. 172. – P. 112752.
148. The Disease Severity and Clinical Outcomes of the SARS-CoV-2 Variants of Concern / L. Lin, Y. Liu, X. Tang, D. He // *Frontiers in Public Health*. – 2021. – Vol. 9. – P. 775224.
149. The differences in virus shedding time between the Delta variant and original SARS-CoV-2 infected patients / F. Li, J. Deng, C. Xie [et al.] // *Frontiers in Public Health*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1132643.
150. Alpha to Omicron: Disease Severity and Clinical Outcomes of Major SARS-CoV-2 Variants / F. P. Esper, T. M. Adhikari, Z. J. Tu [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 227. – Alpha to Omicron. – № 3. – P. 344-352.
151. Changes in symptoms and characteristics of COVID-19 patients across different variants: two years study using neural network analysis / S. H. Torabi, S. M. Riahi, A. Ebrahimzadeh, F. Salmani // *BMC Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 838.
152. The Key Roles of Interferon Lambda in Human Molecular Defense against Respiratory Viral Infections / A. A. Lozhkov, S. A. Klotchenko, E. S. Ramsay [и др.] // *Pathogens (Basel, Switzerland)*. – 2020. – Vol. 9. – № 12. – P. 989.
153. Beneficial effects of multi-disciplinary rehabilitation in postacute COVID-19: an observational cohort study / B. Puchner, S. Sahanic, R. Kirchmair [и др.] // *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*. – 2021. – Vol. 57. – Beneficial effects of multi-disciplinary rehabilitation in postacute COVID-19. – № 2. – P. 189-198.
154. Long COVID, a comprehensive systematic scoping review / H. Akbarialiabad, M. H. Taghrir, A. Abdollahi [et al.] // *Infection*. – 2021. – Vol. 49. – № 6. – P. 1163-1186.
155. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations / H. E. Davis, L. McCorkell, J. M. Vogel, E. J. Topol // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – Vol. 21. – № 3. – P. 133-146.

156. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: Role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1 / A. M. O'Hara, A. Bhattacharyya, J. Bai [et al.] // *Cytokine*. – 2009. – Vol. 46. – Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced IL-8 expression in gastric epithelial cells. – № 3. – P. 359.
157. The role of IL-28, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in predicting response to pegylated interferon/ribavirin in chronic HCV patients / A. G. Abdou, N. Y. Asaad, N. Ehsan [и др.] // *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. – 2015. – Vol. 123. – № 1. – P. 18-27.
158. Taubman, M. A. Chapter 69 - Mucosal Vaccines for Dental Diseases / M. A. Taubman, D. J. Smith // *Mucosal Immunology (Fourth Edition)* / ред. J. Mestecky [и др.]. – Boston : Academic Press, 2015. – P. 1363-1389.
159. Dysregulation of Systemic and Mucosal Humoral Responses to Microbial and Food Antigens as a Factor Contributing to Microbial Translocation and Chronic Inflammation in HIV-1 Infection / Z. Hel, J. Xu, W. L. Denning [и др.] // *PLoS pathogens*. – 2017. – Vol. 13. – № 1. – P. e1006087.
160. Lumelsky, N. Oral-systemic immune axis: Crosstalk controlling health and disease / N. Lumelsky // *Frontiers in Dental Medicine*. – 2023. – Vol. 3.
161. Analysis of post COVID-19 condition and its overlap with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome / O. A. Sukocheva, R. Maksoud, N. M. Beeraka [и др.] // *Journal of Advanced Research*. – 2022. – Vol. 40. – P. 179-196.
162. Serum IL-1 $\beta$  and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters / Y. Zou, X. Chen, J. Liu [et al.] // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2017. – Vol. 12. – Serum IL-1 $\beta$  and IL-17 levels in patients with COPD. – P. 1247-1254.
163. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD / Y. Wang, J. Xu, Y. Meng [et al.] // *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. – 2018. – Vol. 13. – P. 3341-3348.

164. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics / D.-I. Jang, A.-H. Lee, H.-Y. Shin [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 5. – P. 2719.
165. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial of Infliximab, a Chimeric Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Patients With Moderate-to-Severe Heart Failure / E. S. Chung, M. Packer, K. H. Lo [и др.] // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – № 25. – P. 3133-3140.
166. The Important Role of Interleukin-2 in COVID-19 / L. Ghanbari Naeini, L. Abbasi, F. Karimi [et al.] // Journal of Immunology Research. – 2023. – Vol. 2023. – P. 7097329.
167. Interleukin-3 is a predictive marker for severity and outcome during SARS-CoV-2 infections / A. Bénard, A. Jacobsen, M. Brunner [et al.] // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1112.
168. Changes in nasal, pharyngeal and salivary secretory IgA levels in patients with COVID-19 and the possibility of correction of their secretion using combined intranasal and oral administration of a pharmaceutical containing antigens of opportunistic microorganisms / M. Kostinov, O. Svitich, A. Chuchalin, N. Abramova [et al.] // Drugs in Context. – 2023. – Vol. 12. – P. 2022-10-4.
169. Immunoglobulin A response to SARS-CoV-2 infection and immunity / K. Esmat, B. Jamil, R. K. Kheder [et al.] // Heliyon. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. e24031.
170. Sousa-Pereira, P. de. IgA: Structure, Function, and Developability / P. de Sousa-Pereira, J. M. Woof // Antibodies. – 2019. – Vol. 8. – IgA. – № 4. – P. 57.