© Коллектив авторов, 2021

Ганковская Л.В.¹, Зинина Е.В.¹, Ганковский В.А.², Семушкин А.Р.¹

Изменение экспрессии Toll-подобных рецепторов, цитокинов и хемокинов в клетках слизистой оболочки ротоглотки у детей при COVID-19

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117990, г. Москва, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт педиатрии и охраны здоровья детей Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральная клиническая больница Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 119333, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. COVID-19 – тяжелое респираторное заболевание, вызванное β-коронавирусом SARS-CoV-2, которое характеризуется иммуноопосредованным повреждением тканей и органов. Доказано, что у детей заболевание протекает относительно легко по сравнению со взрослыми и механизмы врожденного иммунитета играют в этом важную роль.

Цель исследования – изучение экспрессии генов, кодирующих рецепторы врожденного иммунитета TLR4, TLR7, а также анализ изменения экспрессии провоспалительных цитокинов: интерлейкина(ИЛ)-1β, фактора некроза опухолей (ФНО)α и интерферона(ИФН)-α – на уровне гена и белка у детей с COVID-19 в зависимости от тяжести течения заболевания.

Материал и методы. В исследование включены 55 детей с подтвержденным диагнозом COVID-19. Группы пациентов формировали на основании жалоб и клинических проявлений. 1-я группа детей с бессимптомным течением включала 9 человек. Во 2-ю группу входили дети с легкой формой течения – 36 человек, в 3-ю группу – со среднетяжелой формой течения (10 человек). Группу сравнения составили 25 здоровых детей. Из полученного материала выделяли РНК и методом полимеразной цепной реакции в реальном времени определяли уровень экспрессии генов, а также методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа определяли уровень содержания цитокинов в надосадочной жидкости.

Результаты. Показано статистически достоверное увеличение экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета (*TLR4*, *TLR7*) в клетках слизистой оболочки ротоглотки у детей с COVID-19. Экспрессия *TLR4* и *TLR7* была, соответственно, в 2,6 и 7,2 раза выше у детей со среднетяжелым течением по сравнению с группой здоровых. Вместе с этим выявлено повышение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ФНОα, ИФН-α) на уровне гена и белка, ассоциированное с тяжестью течения COVID-19. Также было показано увеличение продукции хемокинов, которое коррелировало с тяжестью течения заболевания.

Обсуждение. Увеличение уровня экспрессии генов *TLR4* и *TLR7* клетками слизистой ротоглотки у детей с COVID-19 указывает на их роль в патогенезе заболевания. Основная функция TLR4 и TLR7 заключается в распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, а именно гликопротеина шипа, участвующего в проникновении вируса в клетки-мишени и одноцепочечной РНК вируса. Активация TLR4 и TLR7 приводит к Toll-индуцируемой экспрессии генов провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ФНОα, ИФН-α) и хемокинов, достоверное увеличение экспрессии генов и продукции белка которых были нами продемонстрированы. Это играет огромную роль в развитии воспалительной реакции и говорит об изменениях во врожденном иммунитете слизистых оболочек при COVID-19.

Заключение. Полученные нами данные могут быть использованы для дальнейшего изучения и определения молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с COVID-19 у детей, что позволит в будущем подобрать оптимальный вариант терапии.

Для корреспонденции

Ганковская Людмила Викторовна –
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой иммунологии
медико-биологического факультета
ФГАОУ ВО «РНИМУ
им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: lvgan@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1271-3078>

Ключевые слова: врожденный иммунитет; COVID-19; Toll-подобные рецепторы; провоспалительные цитокины; хемокины

Статья получена 26.04.2021. Принята в печать 26.05.2021.

Для цитирования: Ганковская Л.В., Зинина Е.В., Ганковский В.А., Семушкин А.Р. Изменение экспрессии Toll-подобных рецепторов, цитокинов и хемокинов в клетках слизистой оболочки ротоглотки у детей при COVID-19. Иммунология. 2021; 42 (3): 222–231. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-222-231>

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Gankovskaya L.V.¹, Zinina E.V.¹, Gankovskii V.A.², Semushkin A.R.¹

Changes in the expression of Toll-like receptors, cytokines and chemokines in the cells of the mucous membrane of the oropharynx in children with COVID-19

¹ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

² Pediatrics and Child Health Research Institute of the «Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences», Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 119333, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. COVID-19 is a severe respiratory disease caused by the β -coronavirus SARS-CoV-2, which is characterized by immune-mediated tissue and organ damage. It has been proven that the disease in children is relatively easy compared to adults, and the mechanisms of innate immunity play an important role in this.

The aim of the investigation was to study the expression of genes encoding the innate immunity receptors TLR4, TLR7, as well as to analyze changes in the expression of proinflammatory cytokines – interleukin(IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- α – in children with COVID-19, depending on the severity of the disease.

Material and methods. The study included 55 children with a confirmed diagnosis of COVID-19. Patient groups were formed on the basis of complaints and clinical manifestations. The 1st group of asymptomatic children included 9 people. The 2nd group included children were with a mild form of the course – 36 people, the 3rd group consisted of children with a moderate form of the course (10 people). The group of comparison consisted of 25 healthy children. RNA was isolated from the obtained material and the level of gene expression was determined by polymerase chain reaction in real time, and the level of cytokines in the supernatant was determined by the method of multiplex immunofluorescence analysis.

Results. A statistically significant increase in the expression of genes for innate immunity receptors (*TLR4*, *TLR7*) in the cells of the mucous membrane of the oropharynx in children with COVID-19 has been shown. The expression of TLR4 and TLR7 was, respectively, 2.6 and 7.2 times higher in children with moderate course compared with the healthy group. At the same time, an increase in the level of expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , IFN- α) at the gene and protein levels, associated with the severity of COVID-19 was revealed. Our study also showed an increase in the production of chemokines, which correlated with the severity of the disease.

Discussion. An increase in the expression level of the *TLR4* and *TLR7* genes by oropharyngeal mucosa cells in children with COVID-19 indicates their role in the pathogenesis of the disease. The main function of TLR4 and TLR7 is to recognize pathogen-associated molecular patterns, namely, the spike glycoprotein involved in the penetration of the virus into target cells and the single-stranded RNA of the virus. Activation of TLR4 and TLR7 leads to Toll-induced expression of genes for proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , IFN- α) and chemokines, a significant increase in gene expression and protein production of which we have demonstrated. This plays a huge role in the development of the inflammatory response and indicates changes in the innate immunity of the mucous membranes in COVID-19.

Conclusion. The data obtained by us can be used for further study and determination of molecular genetic markers associated with COVID-19 in children, which will allow us to select the optimal therapy option in the future.

For correspondence

Lyudmila V. Gankovskaya –
MD, PhD, Professor,
Head of Immunology Chair,
Med.-Biol. Faculty
of N.I. Pirogov RNIMU,
MOH of Russia,
Moscow, Russian Federation
E-mail: lvgan@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0003-1271-3078>

Keywords: innate immunity; COVID-19; Toll-like receptors; proinflammatory cytokines; chemokines

Received 26.04.2021. **Accepted** 26.05.2021.

For citation: Gankovskaya L.V., Zinina E.V., Gankovskii V.A., Semushkin A.R. Changes in the expression of Toll-like receptors, cytokines and chemokines in the cells of the mucous membrane of the oropharynx in children with COVID-19. *Immunologiya*. 2021; 42 (3): 222–31. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-222-231> (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

COVID-19 – это инфекционное заболевание, вызываемое оболочечным одноцепочечным (+) РНК-вирусом, относящимся к семейству β -коронавирусов (SARS-CoV-2). В первую очередь вирус поражает дыхательную систему, вызывая гриппоподобное заболевание, а в более тяжелых случаях может привести к развитию острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и полиорганной недостаточности [1]. Проникновение вируса в клетки человека опосредуется взаимодействием гликопротеина шипа (S-белок) вируса с ангиотензин-превращающим ферментом-2 (ACE2), который является функциональным рецептором SARS-CoV-2 [2].

Изучение механизмов иммунопатогенеза заболевания является актуальной задачей. Ведущую роль в развитии воспалительной реакции играют механизмы врожденного иммунитета. При помощи паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета (PRR – pattern recognition receptors), особенно Toll-подобных рецепторов (TLR), происходит распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP – pathogen-associated molecular pattern) вируса, а также эндогенных сигналов, связанных с повреждением (DAMP – damage-associated molecular pattern) [3]. При распознавании SARS-CoV-2 наибольшую роль имеют TLR4 и TLR7. Лигандом для TLR4 в условиях инфекции, вызванной SARS-CoV-2, является гликопротеин шипа вируса (S-белок). Y. Zhao и соавт. с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса было выявлено, что S-белок обладает большим сродством к TLR4 [4]. Белки теплового шока, фибриноген и фосфолипиды, высвобождаемые во время повреждения клеток вирусом, также являются лигандами для TLR4. Активация TLR4 приводит к повышению экспрессии ACE2, что способствует проникновению вируса, а также индуцирует экспрессию генов интерферонов (ИФН) I типа (ИФН- α и ИФН- β). ИФН I типа представляют собой цитокины, обеспечивающие 1-ю линию защиты от вирусных инфекций. Помимо ИФН, происходит повышение экспрессии хемокинов, благодаря которым происходит привлечение клеток в очаг воспаления [5, 6].

TLR7 расположен на мембране эндосомы и участвует в распознавании одноцепочечной РНК SARS-CoV-2 после его проникновения в клетку-мишень. Активация TLR7 в большой степени индуцирует продукцию интерлейкина(ИЛ)-1 β , фактора некроза опухолей (ФНО) α , моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-1. Повышение экспрессии TLR7 при вирусных

инфекциях может вызвать более высокий провоспалительный ответ у пациентов и привести к острому повреждению легких [7].

Было выявлено, что у детей наблюдаются более низкие показатели заражения SARS-CoV-2 по сравнению со взрослыми. Также у детей в большинстве случаев заболевание протекает в более легкой форме [8]. К настоящему времени не проведено исследований, позволяющих оценить врожденный иммунитет в слизистой ротоглотки у детей с COVID-19 в зависимости от тяжести течения заболевания. Исследование молекулярных механизмов функционирования системы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек позволит выявить маркеры тяжелого течения заболевания и предложить оптимальный вариант терапии.

В связи с вышесказанным **цели** данной работы – изучение экспрессии генов, кодирующих рецепторы врожденного иммунитета TLR4, TLR7, а также анализ изменения экспрессии провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 β , ФНО α и ИФН- α – на уровне гена и белка у детей с COVID-19 в зависимости от тяжести течения заболевания.

Материал и методы

В исследование были включены 55 детей с подтвержденным диагнозом COVID-19 (средний возраст – 9 ± 5 лет). Группы пациентов формировали на основании жалоб и клинических проявлений. 1-я группа включала 9 детей с бессимптомным течением COVID-19, у данных детей отсутствовали клинические признаки заболевания при положительном результате лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2. Большинство обследованных детей были с легкой формой течения, которая характеризуется легкими симптомами интоксикации (лихорадка $< 38,5$ °C, слабость и боль в горле). Они были включены во 2-ю группу (36 человек). 3-я группа состояла из детей со среднетяжелой формой течения заболевания (10 человек). У них наблюдались лихорадка $> 38,5$ °C и бронхит. Группу сравнения составили 25 здоровых детей (средний возраст 10 ± 5 лет). Набор материала осуществлялся на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская поликлиника № 212 Департамента здравоохранения города Москвы» филиал № 5 (заведующий филиалом № 5 – Е.Л. Савостьянова).

Критерии включения: положительный результат лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2; длительность заболевания 3 дня; письменное согласие пациентов на участие в исследовании.

Таблица 1. Панель праймеров для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени

Исследуемый ген	Нуклеотидная последовательность праймеров, 5'–3'	Нуклеотидная последовательность обратных праймеров, 3'–5'
<i>TLR4</i>	CCCTGAGGCATTTAGGCAGCTA	AGGTAGAGAGGTGGCTTAGGCT
<i>TLR7</i>	CCTTGAGGCCAACAACATCT	GTAGGGACGGCTGTGACATT
<i>IL1B</i>	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
<i>IFNA</i>	AGAAGGCTCCAGCCATCTCTGT	TGCTGGTAGAGTTTCGGTGCAGA
<i>TNFA</i>	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC

Критерии исключения: длительность заболевания более 3 дней.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). В установленном порядке было получено информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

В ходе работы определяли уровень экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета (*TLR4* и *TLR7*), генов провоспалительных цитокинов (*IL1B*, *TNFA*, *IFNA*) в клетках слизистой оболочки ротоглотки у детей при COVID-19 с разной тяжестью течения. Также было изучено содержание ИЛ-1β, ФНОα, ИФН-α и хемокинов в надосадочной жидкости. Взятие материала производили путем осторожного соскоба со слизистой оболочки ротоглотки стерильными зондами с тампоном типа A2. После взятия один зонд погружали в лизирующий буфер, а другой зонд – в физиологический раствор. Взятие материала зондом обеспечивает содержание в образце эпителиальных клеток [9].

Из полученных образцов, находящихся в лизирующем буфере, выделяли РНК с использованием набора для выделения ДНК/РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля «Рибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия) по протоколу производителя. Полученную РНК хранили при -70 °С. Далее с помощью набора для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) (Синтол, Россия) проводили реакцию ОТ для получения кДНК на основе выделенной РНК. После этого кДНК использовали для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили с применением набора реагентов для ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол, Россия) [10]. В качестве эндогенного контроля был использован ген «домашнего хозяйства» (housekeeping gene), который представляет собой конститутивно экспрессируемый ген (*ACTB* – ген, кодирующий β-актин) [11]. ПЦР-РВ проводили с использованием праймеров, приведенных в табл. 1.

Экспрессию генов оценивали методом измерений по $\Delta\Delta C_t$, получая результаты в виде относительных единиц, показывающих во сколько раз больше или меньше

экспрессия исследуемого гена в образце по отношению к гену домашнего хозяйства (*ACTB*). Расчет результатов производился по формуле:

$$R=2^{-[\Delta C_t(\text{исследуемого гена})-\Delta C_t(\text{гена } ACTB)]},$$

где C_t – порог насыщения реакции (cycle threshold), R – относительная экспрессия.

В образцах, находящихся в физиологическом растворе, определяли содержание цитокинов методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на панели Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening 48-plex (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя. При помощи устройства Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader получали данные, представленные в виде концентрации исследуемого аналита (пг/мл) [12]. Для нормализации результатов мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа содержание цитокинов рассчитывали в пересчете на мг общего белка. Концентрация цитокинов представлена в пг/мг общего белка.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016 и программного пакета GraphPad Prism 8 (США). В связи с разным количеством значений в группах и ненормальным распределением были выбраны непараметрические методы анализа. Данные на графиках представлены с указанием медианы, 10–90-го перцентилей и крайних значений.

Результаты

На первом этапе были исследованы уровни экспрессии генов *TLR4* и *TLR7* у детей с COVID-19 с разной тяжестью течения заболевания и проведено сравнение с соответствующим показателем в соскобах со слизистой ротоглотки у детей группы сравнения. Выбор генов данных рецепторов связан с тем, что при инфекции, вызванной SARS-CoV-2, *TLR4* и *TLR7* обладают наибольшим сродством к PAMP вируса (спайковый гликопротеин и одноцепочечная РНК вируса, соответственно) [13]. Взаимодействие данных рецепторов с этими лигандами индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов.

Было выявлено, что экспрессия генов *TLR4* и *TLR7* в клетках слизистой ротоглотки у детей со среднетяжелым течением COVID-19 значимо выше, чем в клетках здоровых детей группы сравнения в 2,6 ($p = 0,0053$) и в 7,2 раза ($p = 0,0253$) соответственно. Также был про-

Рис. 1. Экспрессия генов *TLR4* и *TLR7* в клетках слизистой оболочки ротоглотки детей с COVID-19 с разной тяжестью течения и группы сравнения

веден сравнительный анализ экспрессии генов *TLR4* и *TLR7* в клетках слизистой ротоглотки у детей с легким течением заболевания и у детей группы сравнения. В клетках слизистой ротоглотки у детей с легким течением отмечается достоверное повышение экспрессии гена *TLR7* в 3,4 раза ($p = 0,0122$). Также отмечается увеличение в 2 раза экспрессии гена *TLR7* у детей с бессимптомным течением инфекции. При этом не выявлено достоверного увеличения экспрессии гена *TLR4* у детей с бессимптомным и легким течением ($p = 0,0568$), что говорит об отсутствии различий между группами (рис. 1).

Активация TLRs индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, поэтому далее мы изучали экспрессию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ФНО α , ИФН- α на уровне гена и белка у детей с COVID-19 с разной тяжестью течения (среднетяжелое, легкое и бессимптомное). Мы обнаружили достоверное повышение уровня экспрессии гена *IL1B* в клетках слизистой ротоглотки у детей со среднетяжелым течением заболевания в 6,5 раз ($p = 0,05$) и в 4,2 раза у детей с легкой формой течения ($p = 0,001$). Также наблюдалось достоверное повышение содержания ИЛ-1 β у де-

Рис. 2. Экспрессия ИЛ-1 β на уровне гена (А) и белка в смывах со слизистой оболочки ротоглотки (Б) детей с COVID-19 разной степени тяжести

Рис. 3. Экспрессия ИФН-α на уровне гена (А) и белка в смывах со слизистой оболочки ротоглотки (Б) у детей с COVID-19 с разной тяжестью течения

тей со среднетяжелым течением COVID-19 в 4,7 раз ($p = 0,007$) по сравнению со здоровыми детьми. Его содержание составило 15,77 пг/мг общего белка (рис. 2).

Кроме того, в 2,3 раза увеличивалась экспрессия гена *IFN-α* в клетках слизистой ротоглотки у детей со среднетяжелым течением по отношению к группе сравнения ($p=0,045$). При исследовании уровня продукции ИФН-α у детей со среднетяжелым течением было замечено увеличение продукции цитокина в 1,4 раза ($p=0,0059$) (рис. 3).

Далее мы исследовали уровень экспрессии гена *TNFA* в клетках слизистой ротоглотки у детей

с COVID-19. Так, у пациентов со среднетяжелым течением наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *TNFA* в 5,2 раза ($p = 0,0343$), а у детей с легкой формой – в 4,3 раза ($p = 0,0115$) по отношению к группе сравнения. Также было выявлено повышение уровня продукции ФНОα в 1,2 раза ($p = 0,009$) у детей со средней тяжестью COVID-19 относительно группы сравнения. Его содержание составило 20,34 пг/мг общего белка (рис. 4).

У пациентов уровень экспрессии генов *IFN-α* и *TNFA* более выражен по сравнению с синтезом этих моле-

Рис. 4. Экспрессия ФНОα на уровне гена (А) и белка в смывах со слизистой оболочки ротоглотки (Б) у детей с COVID-19 с разной тяжестью течения

Рис. 5. Содержание хемокинов (CCL11, MCP-1, SDF-1α, MIF) в смывах со слизистой ротоглотки у детей с COVID-19 разной степени тяжести

кул. Данный результат можно объяснить тем, что при действии SARS-CoV-2 на клетки могут нарушаться процессы трансляции белка. Недавними исследованиями было показано, что гены вируса, кодирующие неструктурные белки (NSP1–NSP16), способны подавлять сплайсинг мРНК в клетках, что может привести к ингибированию трансляции [14].

Также было обнаружено, что уровень экспрессии провоспалительных цитокинов у детей с бессимптомным течением практически не изменялся по сравнению со здоровыми детьми. Различия были статистически недостоверными ($p > 0,05$). Сравнение уровня цитокинов в смывах со слизистой оболочки ротоглотки у детей с легким течением заболевания и здоровой группы не выявило статистически значимых различий.

Известно, что активация TLR4 и TLR7 запускает также продукцию хемокинов, в том числе эотаксина (CCL11), MCP-1, фактора стромального происхождения-1 (SDF-1 – хемокин подсемейства CXC) и фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), что приводит к привлечению клеток иммунной системы в очаг воспаления [15]. Поэтому целесообразно было оценить содержание хемокинов в смывах со слизистой оболочки ротоглотки у детей с COVID-19 с различной тяжестью течения заболевания и у здоровых детей.

При исследовании концентрации хемокинов было выявлено достоверное повышение их содержания в группе больных детей со среднетяжелой степенью COVID-19 относительно группы здоровых детей. При сравнении концентраций хемокинов внутри выборки больных COVID-19 прослеживается тенденция к повышению их концентрации с ростом степени тяжести заболевания. Так, нами обнаружено увеличение концентрации эотаксина в 1,5 раз ($p = 0,0028$), MCP-1 – в 1,3 раза ($p = 0,0380$), SDF-1α – в 1,8 раз ($p = 0,0349$) и MIF – в 5 раз ($p = 0,0071$) у детей со среднетяжелым течением по сравнению со здоровыми детьми. Также определено, что содержание MIF было наибольшим относительно других хемокинов и составило 6741,57 пг/мг

общего белка (рис. 5). Помимо этого, нами проанализирована продукция MCP-3, макрофагального воспалительного белка-1α (MIP-1α) и ИЛ-8, который играет ключевую роль в привлечении нейтрофилов в очаг воспаления. При различных формах течения заболевания у детей продукция данных хемокинов не изменялась и определялась в следовых количествах (< 2 пг/мг общего белка).

Обсуждение

Система врожденного иммунитета является 1-й линией защиты от вирусной инфекции, и характер иммунного ответа может существенно влиять на течение заболевания [16]. Известно, что у детей COVID-19 протекает более в легкой форме по сравнению со взрослыми. Существует несколько причин такого явления. Показано, что у детей снижена экспрессия гена *ACE2* в эпителиальных клетках слизистых оболочек, это приводит к замедлению проникновения вируса в клетки-мишени [17]. Также для детей характерен более ранний ответ на патоген, в частности за счет выработки ИФН I типа в очаге воспаления, которые оказывают противовирусную защиту путем снижения экспрессии вирусной мРНК [18]. Однако до настоящего времени не проведено исследований, позволяющих оценить функционирование системы врожденного иммунитета локально, в месте проникновения вируса. Поэтому мы исследовали рецепторы врожденного иммунитета, провоспалительные цитокины и хемокины в слизистой оболочке ротоглотки у детей с заболеванием разной степени тяжести.

Увеличение уровня экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета доказывает их огромную роль в патогенезе коронавирусного заболевания. При активации TLR4, расположенного на поверхности клетки, и TLR7, расположенного на эндосомах, происходит активация адаптерной молекулы MyD88, которая в свою очередь приводит к активации ядерных факторов транскрипции, таких, как NF-κB (Nuclear factor κB) и AP-1

(Activator protein-1), которые обеспечивают выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов [19]. Повышение уровня Toll-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов, в особенности ИЛ-1 β , ФНО α , ИФН- α , зависит от тяжести заболевания и может служить прогностическим критерием его развития и исхода [20, 21].

Помимо выработки провоспалительных цитокинов, активация рецепторов врожденного иммунитета, в большей степени TLR4, индуцирует экспрессию хемокинов, таких как MCP-1, SDF-1 α , MIF. Кроме того, повышенная продукция ИЛ-1 β и ФНО α также может индуцировать экспрессию хемокинов (CCL11, CCL8), связанных с вирусной инфекцией. Это ведет к привлечению клеток врожденного иммунитета в очаг воспаления [22, 23]. Недавно была показана роль MIF в воспалительной реакции – при инфицировании SARS-CoV-2 происходит привлечение макрофагов в очаг воспаления и значительное повышение секреции MIF эпителиальными клетками, который в свою очередь увеличивает секрецию ИЛ-1 β и ФНО α , что приводит к более тяжелому течению инфекции, вплоть до развития острого респираторного дистресс-синдрома [24]. Нами также продемонстрировано значительное увеличение уровня MIF у детей при среднетяжелой форме течения COVID-19.

Также выявлена значимая роль SDF-1 α в развитии повреждения клеток при инфицировании SARS-CoV-2. При повышении уровня ФНО α происходит активация продукции молекул адгезии и хемокинов, в значительной степени – SDF-1 α . Благодаря этому увеличивается адгезия Т-лимфоцитов к эндотелиальным клеткам, что способствует повреждению сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки ротоглотки у детей со среднетяжелым течением COVID-19 и приводит к длительному воспалению [25].

Было показано, что наибольшую роль в воспалении у детей играет ИЛ-1 β при незначительном увеличении уровня других провоспалительных цитокинов, именно поэтому у детей в очень редких случаях наблюдается развитие «цитокинового шторма», в отличие от взрос-

лых [26]. Это позволяет предположить, что повышение уровня ИЛ-1 β может быть предиктором развития клинических симптомов у детей.

Нами также выявлены незначительные изменения экспрессии и продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов у детей с бессимптомным и легким течением. У детей с легким и бессимптомным течением наблюдается увеличение уровня ИФН- α и некоторых хемокинов (эотаксина и SDF-1 α) относительно группы сравнения. Ранний интерфероновый ответ в инкубационный период SARS-CoV-2 может ограничить вирусную репликацию и способствовать бессимптомному течению заболевания [10].

Считается, что при инфицировании клеток SARS-CoV-2 наибольшую роль играют такие хемокины, как MIP-1 α и ИЛ-8, увеличение содержания которых происходит при прогрессировании заболевания. Повышение уровня ИЛ-8 может даже использоваться в качестве биомаркера различных стадий заболевания [27]. При исследовании продукции этих хемокинов у детей с COVID-19 нами не замечено увеличения их содержания, что также может свидетельствовать о более легком течении заболевания у детей по сравнению со взрослыми.

Заключение

Проведенное нами исследование экспрессии цитокинов на уровне гена и белка в слизистой ротоглотки у детей с COVID-19 позволяет лучше понять роль врожденного иммунитета в патогенезе заболевания. Полученные данные объясняют механизм течения заболевания у детей с разной степенью тяжести, что может помочь в дальнейшей разработке эффективной терапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования, руководство написанием статьи, редактирование – Ганковская Л.В.; составление карты обследования пациентов, их клиническая характеристика и анализ данных – Ганковский В.А.; сбор и обработка биологического материала – Семушкин А.Р.; отработка методики, статистическая обработка, написание текста – Зинина Е.В.

Литература

1. Гудима Г.О., Хаитов Р.М., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Молекулярно-иммунологические аспекты диагностики, профилактики и лечения коронавирусной инфекции. Иммунология. 2021; 42 (3): 198–210. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-198-210>
2. Brooke G.N., Prischi F. Structural and functional modelling of SARS-CoV-2 entry in animal models. Sci Rep. 2020; 10 (1): 15–7. DOI: 10.1038/s41598-020-72528-z
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2011. 640 с.
4. Zhao Y., Kuang M., Li J., Zhu L., Jia Z., Guo X., Hu Y., Kong J., Yin H., Wang X. SARS-CoV-2 spike protein interacts with activates TLR4. Cell Research. 2021. DOI: 10.1038/s41422-021-00495-9
5. Aboudounya M.M., Heads R.J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. Mediators of Inflammation. 2021; 2021 (12): 1–18. DOI: 10.1155/2021/8874339
6. Gankovskaya L.V., Bykova V.P., Namasova-Baranova L.S., Karaulov A.V., Rahmanova I.V., Gankovskii V.A., Merkusheva C.D., Svitich O.A. Innate immunity gene expression by epithelial cells of upper respiratory tract in children with adenoid hypertrophy. Auris Nasus Larynx. 2018; 45 (4): 753–9. DOI: 10.1016/j.anl.2017.11.011
7. Khanmohammadi S., Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. J Med Virol. 2021; 93 (5): 2735–9. DOI: 10.1002/jmv.26826
8. Yasuhara J., Kuno T., Takagi H., Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. Pediatric Pulmonology. 2020; 55 (10): 2565–75. DOI: 10.1002/ppul.24991
9. Страмбовская Н.Н., Дутова А.А., Дагбаева С.Д. Взятие, хранение, транспортировка клинического материала для ПЦР-диагностики: методические указания. РИЦ ГБОУ ВПО ЧГМА, 2013. 21 с.

10. Меркушова Е.Д. Гиперэкспрессия генов инфламасомного комплекса NLRP1 и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных с псориазом. Иммунология. 2021; 42 (1): 21–8. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-1-21-28
11. Ребриков Д.В. ПЦР «в реальном времени». Москва : Бином. Лаборатория знаний, 2009. 223 с. ISBN: 978-5-00101-085-2
12. Bio-Rad: Bio-Plex Pro Human Cytokine Assays. Instruction Manual. 23 с.
13. Brandão S.C.S., Ramos J.O.X., Dompieri L.T., Godoi E.T.A.M., Figueiredo J.L., Sarinho E.S.C., Chelvanambi S., Aikawa M. Is Toll-like receptor 4 involved in the severity of COVID-19 pathology in patients with cardiometabolic comorbidities? Cytokine & Growth Factor Reviews. 2020; 58: 102–10. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.09.002
14. Banerjee A.K., Blanco M.R., Bruce E.A., Honson D.D., Chen L.M., Chow A., Bhat P., Ollikainen M., Quinodoz S.A., Loney C., Thai J., Miller Z.D., Lin A.E., Schmidt M.M., Stewart D.G., Goldfab D., Lorenzo G., Rihn S.J. Guttman M. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. Cell. 2020; 183 (5): 1325–39. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.004
15. Gu Q., Shi Q., Yang H. The Role of TLR and Chemokine in Wear Particle-Induced Aseptic Loosening. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012; 1–9. DOI: 10.1155/2012/596870
16. Пашенков М.В., Хаитов М.Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов. Иммунология. 2020; 41 (1): 5–18 DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18
17. Buonsenso D., Sali M., Pata D., De Rose C., Sanguinetti M., Valentini P., Delogu G. Children and COVID-19: Microbiological and immunological insights. Pediatric Pulmonology. 2020; 55 (10): 2547–55. DOI: 10.1002/ppul.24978
18. Fialkowski A., Gernez Y., Arya P., Weinacht K., Kinane T.B., Yonker L. Insight into the pediatric and adult dichotomy of COVID-19: Age-related differences in the immune response to SARS-CoV-2 infection. Pediatric Pulmonology. 2020; 55 (10): 2556–64. DOI: 10.1002/ppul.24981
19. Cuevas A.M., Clark J.M., Potter J.J. Increased TLR/MyD88 signaling in patients with obesity: is there a link to COVID-19 disease severity? Int J Obes. 2021; 26: 1–3. DOI: 10.1038/s41366-021-00768-8
20. Sherwani S., Khan M.W.A. Cytokine Response in SARS-CoV-2 Infection in the Elderly. Journal of Inflammation Research. 2020; 13: 737–747. DOI: 10.2147/JIR.S276091
21. Болдырева М.Н. Вирус SARS-CoV-2 и другие эпидемические коронавирусы: патогенетические и генетические факторы развития инфекций. Иммунология. 2020; 41 (3): 197–205. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-197-205
22. Schaefer T.M., Desouza K., Fahey J.V., Beagley K.W., Wira C.R. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. Immunology. 2004; 112 (3): 428–36. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01898.x
23. Khalil B.A., Elemam N.M., Maghazachi A.A. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2021; 19: 976–988. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.034
24. Lai K.N., Leung J.C.K., Metz C.N., Lai F.M., Bucala R., Lan H.Y. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. J. Pathol. 2003; 199 (4): 496–508. DOI: 10.1002/path.1291
25. Ackermann M., Mentzer S.J., Kolb M., Jonigk D. Inflammation and intussusceptive angiogenesis in COVID-19 everything in and out of flow. European Respiratory journal. 2020; 56 (5). DOI: 10.1183/13993003.03147-2020
26. Wong L.S.Y., Loo E.X.L., Kang A.Y.H., Lau H.X., Tambyah P.A., Tham E.H. Age-Related Differences in Immunological Responses to SARS-CoV-2. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2020; 8 (10): 3251–8. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.08.026
27. Li L., Li J., Gao M., Fan H., Wang Y., Xu X., Chen C., Liu J., Kim J., Aliyari R., Zhang J., Jin Y., Li X., Ma F., Shi M., Cheng G., Yang H. Interleukin-8 as a Biomarker for Disease Prognosis of Coronavirus Disease-2019 Patients. Frontiers in Immunology. 2021; 11: 602395. DOI: 10.3389/fimmu.2020.602395

■ References

1. Gudima G.O., Khaitov R.M., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Molecular immunological aspects of diagnostics, prevention and treatment of coronavirus infection. Immunologiya. 2021; 42 (3): 198–210. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-3-198-210> (in Russian)
2. Brooke G.N., Prisch F. Structural and functional modelling of SARS-CoV-2 entry in animal models. Sci Rep. 2020; 10 (1): 15–7. DOI: 10.1038/s41598-020-72528-z
3. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology: textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 640 p. (in Russian)
4. Zhao Y., Kuang M., Li J., Zhu L., Jia Z., Guo X., Hu Y., Kong J., Yin H., Wang X. SARS-CoV-2 spike protein interacts with activates TLR4. Cell Research. 2021. DOI: 10.1038/s41422-021-00495-9
5. Aboudounya M.M., Heads R.J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. Mediators of Inflammation. 2021; 2021 (12): 1–18. DOI: 10.1155/2021/8874339
6. Gankovskaya L.V., Bykova V.P., Namasova-Baranova L.S., Karaulov A.V., Rahmanova I.V., Gankovskii V.A., Merkushova C.D., Svitich O.A. Innate immunity gene expression by epithelial cells of upper respiratory tract in children with adenoid hypertrophy. Auris Nasus Larynx. 2018; 45 (4): 753–9. DOI: 10.1016/j.anl.2017.11.011
7. Khanmohammadi S., Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. J Med Virol. 2021; 93 (5): 2735–9. DOI: 10.1002/jmv.26826
8. Yasuhara J., Kuno T., Takagi H., Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. Pediatric Pulmonology. 2020; 55 (10): 2565–75. DOI: 10.1002/ppul.24991
9. Strambovskaya N.N., Dutova A.A., Dagbaeva S.D. Taking, storage, transportation of clinical material for PCR diagnostics: guidelines. RIC GBOU VPO ChGMA, 2013. 21 p. (in Russian)
10. Merkushova E.D., Khasanova E.M., Gankovskaya L.V. Huperexpression of NLRP1 inflammasome complex genes and cytokines IL-1 β , IL-18 in biopathes of lesion and healthy skin of patients with psoriasis. Immunologiya. 2021; 42 (1): 21–8. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-1-21-28 (in Russian)
11. Rebrikov D.V. PCR «In Real Time». Moscow: BINOM. Knowledge Laboratory, 2009. 223 p. ISBN: 978-5-00101-085-2 (in Russian)
12. Bio-Rad: Bio-Plex Pro Human Cytokine Assays. Instruction Manual. 23 с.
13. Brandão S.C.S., Ramos J.O.X., Dompieri L.T., Godoi E.T.A.M., Figueiredo J.L., Sarinho E.S.C., Chelvanambi S., Aikawa M. Is Toll-like receptor 4 involved in the severity of COVID-19 pathology in patients with cardiometabolic comorbidities? Cytokine & Growth Factor Reviews. 2020; 58: 102–10. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.09.002
14. Banerjee A.K., Blanco M.R., Bruce E.A., Honson D.D., Chen L.M., Chow A., Bhat P., Ollikainen M., Quinodoz S.A., Loney C., Thai J., Miller Z.D., Lin A.E., Schmidt M.M., Stewart D.G., Goldfab D., Lorenzo G., Rihn S.J. Guttman M. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. Cell. 2020; 183 (5): 1325–39. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.004
15. Gu Q., Shi Q., Yang H. The Role of TLR and Chemokine in Wear Particle-Induced Aseptic Loosening. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012; 1–9. DOI: 10.1155/2012/596870
16. Paschenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. Immunologiya. 2020; 41 (1): 5–18. DOI: 10.33029 / 0206-4952-2020-41-1-5-18 (in Russian)
17. Buonsenso D., Sali M., Pata D., De Rose C., Sanguinetti M., Valentini P., Delogu G. Children and COVID-19: Microbiological and immunological insights. Pediatric Pulmonology. 2020; 55 (10): 2547–55. DOI: 10.1002/ppul.24978
18. Fialkowski A., Gernez Y., Arya P., Weinacht K., Kinane T.B., Yonker L. Insight into the pediatric and adult dichotomy of COVID-19: Age-related differences in the immune response to SARS-CoV-2 infection. Pediatric Pulmonology. 2020; 55 (10): 2556–64. DOI: 10.1002/ppul.24981
19. Cuevas A.M., Clark J.M., Potter J.J. Increased TLR/MyD88 signaling in patients with obesity: is there a link to COVID-19 disease severity? Int. J. Obes. 2021; 26: 1–3. DOI: 10.1038/s41366-021-00768-8

20. Sherwani S., Khan M.W.A. Cytokine Response in SARS-CoV-2 Infection in the Elderly. *Journal of Inflammation Research*. 2020; 13: 737–747. DOI: 10.2147/JIR.S276091

21. Boldyreva M.N. SARS-CoV-2 virus and other epidemic coronaviruses: pathogenetic and genetic factors for the development of infections. *Immunologiya*. 2020; 41 (3): 197–205. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-197-205 (in Russian)

22. Schaefer T.M., Desouza K., Fahey J.V., Beagley K.W., Wira C.R.. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology*. 2004; 112 (3): 428–36. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01898.x

23. Khalil B.A., Elemam N.M., Maghazachi A.A. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021; 19: 976–988. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.034

24. Lai K.N., Leung J.C.K., Metz C.N., Lai F.M., Bucala R., Lan H.Y. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 2003; 199 (4): 496–508. DOI: 10.1002/path.1291

25. Ackermann M., Mentzer S.J., Kolb M., Jonigk D. Inflammation and intussusceptive angiogenesis in COVID-19 everything in and out of flow. *European Respiratory journal*. 2020; 56 (5). DOI: 10.1183/13993003.03147-2020

26. Wong L.S.Y., Loo E.X.L., Kang A.Y.H., Lau H.X., Tambyah P.A., Tham E.H. Age-Related Differences in Immunological Responses to SARS-CoV-2. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2020; 8 (10): 3251–8. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.08.026

27. Li L., Li J., Gao M., Fan H., Wang Y., Xu X., Chen C., Liu J., Kim J., Aliyari R., Zhang J., Jin Y., Li X., Ma F., Shi M., Cheng G., Yang H. Interleukin-8 as a Biomarker for Disease Prognosis of Coronavirus Disease-2019 Patients. *Frontiers in Immunology*. 2021; 11: 602395. DOI: 10.3389/fimmu.2020.602395

Сведения об авторах

Ганковская Людмила Викторовна – д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой иммунологии мед.-биол. факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация
E-mail: lvgan@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1271-3078>

Зинина Елена Витальевна – студент мед.-биол. факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация
E-mail: zininalen@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5017-7996>

Ганковский Виктор Анатольевич – вед. науч. сотр., канд. мед. наук, врач-оториноларинголог НИИ Педиатрии ФГБУЗ ЦКБ РАН, Москва, Российская Федерация
E-mail: s.slom2012@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4962-6998>

Семушкин Артем Романович – асп. каф. иммунологии мед.-биол. факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация
E-mail: bjorn95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9250-8973>

Authors' information

Lyudmila V. Gankovskaya – MD, PhD, Prof., Head of Immunology Chair, Med.-Biol. Faculty of N.I. Pirogov RNIMU, MOH of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: lvgan@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1271-3078>

Elena V. Zinina – Student of Med.-Biol. Faculty of N.I. Pirogov RNIMU, MOH of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: zininalen@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5017-7996>

Viktor A. Gankovskii – Leader Researcher, PhD, ENT physician of Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Pediatrics, Moscow, Russian Federation
E-mail: s.slom2012@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4962-6998>

Artem R. Semushkin – Postgraduate Student of the Immunology Chair, Med.-Biol. Faculty of N.I. Pirogov RNIMU, MOH of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: bjorn95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9250-8973>