

ПОЛИМОРФИЗМ TLR-9 (-1237)*Т/С У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Беляева С.В.^{1,2}, Сулова Т.А.^{1,2}, Сташкевич Д.С.¹, Баландина С.Э.¹,
Мякотина Д.Э.¹, Милонченко М.С.¹

¹ ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

² ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», г. Челябинск, Россия

Резюме. COVID-19 – заболевание, исход которого зависит от широкого спектра факторов, в том числе генетических, среди которых особый интерес представляют гены рецепторов врожденной иммунной системы – TLRs, занимающие центральное звено в развитии реакций врожденного иммунного ответа.

В настоящем исследовании нами впервые определены аллельные варианты гена TLR-9 (-1237)*Т/С у русских жителей Челябинской области, переболевших COVID-19 с осложнением в виде двусторонней вирусной пневмонии. Полиморфные варианты TLR-9 (-1237)*Т/С определены методом полимеразной цепной реакции. Установлено, что в группе больных COVID-19 чаще встречался аллель с более высокой транскрипционной активностью TLR-9 (-1237)*С в сравнении с контрольной (19,421% и 11,275% соответственно, $p = 0,019$) и его гомозиготный генотип TLR-9 (-1237)*С, который в группе сравнения не обнаружен. Аллель TLR-9 (-1237)*Т у больных COVID-19 встречался реже в сравнении с контрольной группой (80,579% и 88,725% соответственно, $p = 0,019$). Учитывая различия в экспрессии TLR-9 у больных с более тяжелыми формами заболевания, мы провели сравнение распределения полиморфизма TLR-9 (-1237)*Т/С у больных с разной степенью тяжести COVID-19. В группе больных с легкой формой чаще встречался генотип TLR-9 (-1237)*Т/Т в сравнении с группами больных с более тяжелыми формами. Различия были достоверны на уровне тенденции в сравнении с больными со средней формой (86,364% и 66,000% соответственно, $p = 0,076$).

Ключевые слова: полиморфизм генов, COVID-19, SARS-CoV-2, TLR-9 (-1237)*Т/С, биомаркеры COVID-19

Адрес для переписки:

Беляева Светлана Валерьевна
ФГБОУ ВО «Челябинский государственный
университет»
456658, Россия, Челябинская обл., г. Копейск,
мкр Премьера, 22, кв. 36.
Тел.: 8 (908) 052-18-66.
E-mail: shshvetlana@yandex.ru

Address for correspondence:

Svetlana V. Belyaeva
Chelyabinsk State University
22 Premiere Microdistrict, Apt 36
Kopeisk, Chelyabinsk Region
456658 Russian Federation
Phone: +7 (908) 052-18-66.
E-mail: shshvetlana@yandex.ru

Образец цитирования:

С.В. Беляева, Т.А. Сулова, Д.С. Сташкевич,
С.Э. Баландина, Д.Э. Мякотина, М.С. Милонченко
«Полиморфизм TLR-9 (-1237)*Т/С у больных COVID-19
русских Челябинской области» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 217–222.
doi: 10.46235/1028-7221-9904-TPI

© Беляева С.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Belyaeva, T.A. Suslova, D.S. Stashkevich,
S.E. Balandina, D.E. Myakotina, M.S. Milonchenko
“TLR-9 (-1237)*Т/С polymorphism in Russian COVID-19
patients from the Chelyabinsk Region”, Russian Journal
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2023,
Vol. 26, no. 3, pp. 217–222.
doi: 10.46235/1028-7221-9904-TPI

© Belyaeva S.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-9904-TPI

TLR-9 (-1237)*T/C POLYMORPHISM IN RUSSIAN COVID-19 PATIENTS FROM THE CHELYABINSK REGION

Belyaeva S.V.^{a, b}, Suslova T.A.^{a, b}, Stashkevich D.S.^a, Balandina S.E.^a,
Myakotina D.E.^a, Milonchenko M.S.^a

^a Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. In COVID-19, the clinical outcome depends on a wide range of factors, including genetic features. Among them, TLRs, the genes encoding the receptors of innate immune system are of particular interest since they play the key role in development of innate immune response. The present study concerns the newly identified allelic variants of the TLR-9 (-1237)*T/C gene in Russian residents from the Chelyabinsk Region who had COVID-19 complicated by the bilateral viral pneumonia. Polymorphic variants of TLR-9 (-1237)*T/C were determined by polymerase chain reaction. It was found that, among the COVID-19 patients, a TLR-9 allele (-1237 C) with higher transcriptional activity was more common than in the control group (19.421% and 11.275%, respectively, $p = 0.019$), and its homozygous genotype TLR-9 (-1237)*C was not detected in the comparison group. TLR-9 allele (-1237)*T in the patients with COVID-19 was less common in comparison with the control group (80.579% and 88.725%, respectively, $p = 0.019$). Taking into account the differences in suggested TLR-9 expression in more severe COVID-19 patients, we compared distribution of TLR-9 (-1237)*T/C allele polymorphism in the patients with different severity of COVID-19. In the group of patients with mild form, the TLR-9 (-1237)*T/T genotype was more common as compared with patients who had more severe clinical course. The differences were significant at the trend level when compared with patients with a medium-severity disease (86.364% and 66,000%, respectively; $p = 0.076$).

Keywords: gene polymorphism, COVID-19, SARS-CoV-2, TLR-9 (-1237)*T/C, COVID-19 biomarkers

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, связанная с распространением вируса SARS-CoV-2, является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире [8]. В настоящее время ведется поиск потенциальных биомаркеров заболевания, которые повысят эффективность ранней диагностики, а также позволят разрабатывать методики лечения и предупреждения распространения COVID-19. Одним из таких биомаркеров является Toll-подобный рецептор-9 (TLR-9) [3, 5].

TLR-9 – эндосомальный рецептор, распознающий мотивы РНК и ДНК, богатые неметилированными последовательностями цитозин-фосфат-гуанин (CpG). Поскольку SARS-CoV-2 имеет CpG-мотивы в своем генетическом материале, вполне возможно, что вирус напрямую активирует TLR-9 в эндотелиальных клетках [5]. Мотивы CpG от SARS-CoV-2 достигают TLR-9 через опосредованное ACE2 поглощение вируса в клетки с последующей трансляцией РНК и переносом вирусных CpG-мотивов в эндосому. Активация тромбоцитов и нейтрофилов может

повышать уровень экспрессии TLR-9, что, как предполагается, приводит к постоянному воспалению. Длительная активация TLR-9 индуцирует нижестоящие каскады через MyD88, что вызывает повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов, активацию лимфоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов [5]. Кроме того, данные исследований Costa T.J. и соавт. свидетельствуют о том, что SARS-CoV-2 способствует дисфункции митохондрий, при этом увеличивается высвобождение мтДНК и активируется передача сигналов TLR-9 [6]. Интересно отметить, что уровень циркулирующей мтДНК увеличивается с возрастом, что является фактором, способствующим хроническому воспалению, так называемому «воспалительному старению» у пожилых людей. Эта ось воспалительного старения и TLR-9 может иметь значение в контексте COVID-19, где пожилой возраст связан с большим риском развития тяжелых осложнений COVID-19 [5].

Предполагается, что активация TLR-9 может быть скрытой, но движущей силой, объясняющей

обострение гипервоспаления и тромботических осложнений, наблюдаемых при COVID-19 [5].

Для TLR-9 идентифицировано несколько SNPs, изменяющих восприимчивость к бактериальным и вирусным инфекциям [3]. Ген TLR-9 локализуется в районе генов-супрессоров опухолевого роста на коротком плече 3-й хромосомы человека, кодируется с помощью 2 экзонов, второй из которых представляет основную кодирующую область [1]. Al-Khatib et al. обнаружили, что у людей, несущих аллель TLR-9 (-1237)*С, наблюдается повышенная транскрипционная активность данного гена [4]. Кроме того, полиморфизм TLR-9 (-1237)*С, вызывающий активацию провоспалительных хемокинов и цитокинов, а также адаптивных иммунологических реакций, был связан с более высокой частотой инфекций, приобретенных в отделении интенсивной терапии и иммуноопосредованных заболеваний. Было обнаружено, что аллель TLR-9 (-1237)*С и его гомозиготный генотип TLR-9 (-1237)*С/С в значительной степени связаны с повышенным риском и тяжестью инфекции COVID-19 [3].

Понимание влияния генетической изменчивости на контроль экспрессии гена TLR-9 может дать представление об индивидуальных вариациях риска заболевания и лежащего в его основе патогенеза.

Поэтому целью нашего исследования была оценка распределения частоты встречаемости полиморфизма гена TLR-9 (Т-1237С) у больных COVID-19 русских Челябинской области с разными формами тяжести.

Материалы и методы

Обследуемую группу составил 121 пациент противокоронавирусных госпиталей № 2, 3, 9 города Челябинска с подтвержденной инфекцией COVID-19 русской популяции. Контрольную группу составили 102 здоровых донора Челябинской областной станции переливания крови русской популяции, без прививок, антител к SARS-CoV-2 и не состоящие в Федеральном регистре лиц, больных COVID-19 Единой Государственной Информационной Системы Здравоохранения (ЕГИСЗ). Все участники предоставили информированное согласие на участие в исследовании. Диагноз подтвержден тестом на РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР из мазка из носоглотки (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Для сравнительного анализа между больными с разными формами COVID-19 пациенты были разделены на 3 группы по тяжести течения заболевания. Больные в группах со средней и высокой

степенью тяжести перенесли COVID-19 в форме двусторонней пневмонии. Больные с легкой формой имели антитела (без вакцинации), но не имели выраженных клинических признаков заболевания. Обследуемые не имели сопутствующих тяжелых заболеваний.

Определение SNP в гене TLR-9 выполняли с помощью ПЦР (Т-1237С в гене TLR-9) реактивами ООО НПФ «Литех» (Москва). Интерпретацию результатов проводили с помощью электрофоретической детекции в 3%-м агарозном геле.

С целью статистической обработки полученных результатов нами был использован онлайн-калькулятор «Медицинская статистика», в котором проводилась оценка критерия χ^2 с помощью анализа четырехпольной таблицы. Связь между полиморфизмом гена TLR-9 (-1237)*Т/С и COVID-19 оценивали с помощью критерия отношения шансов (OR) и соответствующих 95% доверительных интервалов (CI) при анализе случаев заболевания с группой сравнения. Достоверность полученных значений считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате сравнительного анализа частоты распределения аллелей и генотипов гена TLR-9 (-1237)*Т/С между контрольной группой и группами больных были обнаружены достоверные различия. Результаты анализа представлены в таблице 1.

В группах больных COVID-19 и контрольной с более высокой частотой встречался аллель TLR-9 (-1237)*Т (80,56% и 88,73% соответственно), за среднюю транскрипционную активность TLR-9, что соответствует распределению у европеоидов [7].

В группе больных COVID-19 чаще встречался аллель TLR-9 (-1237)*С в сравнении с контрольной (19,421% и 11,275% соответственно, $\chi^2 = 5,552$, $p = 0,019$, OR = 1,897, CI 1,107-3,249). Гомозиготный генотип TLR-9 (-1237)*С/С был обнаружен только в группе больных. Данный полиморфизм ассоциирован с повышенной транскрипционной активностью TLR-9 [4], что ведет к гиперпродукции медиаторов воспаления [3], вызывая развитие более тяжелых форм заболевания.

В группе больных COVID-19 реже встречался аллель TLR-9 (-1237)*Т в сравнении с контрольной (80,579% и 88,725% соответственно, $\chi^2 = 5,552$, $p = 0,019$, OR = 0,527, CI 0,308-0,903), что позволяет его рассматривать в качестве протекторного.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ГЕНА TLR-9 (-1237)*T/C В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ COVID-19 И ЗДОРОВЫХ РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

TABLE 1. FREQUENCY DISTRIBUTIONS OF ALLELES AND GENOTYPES OF THE TLR-9 GENE (-1237)*T/C IN GROUPS OF COVID-19 PATIENTS AND HEALTHY RUSSIANS OF THE CHELYABINSK REGION

TLR-9 (-1237) *T/C	Больные COVID-19 COVID-19 patients n = 121		Контрольная группа Control group n = 102		χ^2	p value	OR	CI	
	N	%	N	%					
Аллели Alleles									
T	195	80,579	181	88,725	5,552	0,019	0,527	0,308	0,903
C	47	19,421	23	11,275	5,552	0,019	1,897	1,107	3,249
Генотипы Genotypes									
T/T	88	72,727	79	77,451	0,657	0,418	0,776	0,421	1,433
T/C	19	15,702	23	22,549	1,697	0,193	0,640	0,326	1,257
C/C	14	11,570	0	0	–	< 0,001	–	–	–

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TLR-9 (-1237)*T/C В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 2. DISTRIBUTION OF FREQUENCIES OF ALLELES AND GENOTYPES OF TLR-9 (-1237)*T/C GENE POLYMORPHISM IN GROUPS OF COVID-19 RUSSIAN PATIENTS OF THE CHELYABINSK REGION WITH VARIOUS CLINICAL FORMS OF THE DISEASE

TLR-9 (-1237)* T/C	Тяжелая форма COVID-19 Severe form of COVID-19 n = 49	Средняя форма COVID-19 Average form of COVID-19 n = 50	Легкая форма COVID-19 Light form of COVID-19 n = 22
	%	%	%
Аллели Alleles			
T	80,612	77,000	88,636
C	19,388	23,000	11,364
Генотипы Genotypes			
T/T	73,469	66,000	86,364
T/C	14,286	22,000	4,545
C/C	12,245	12,000	9,091

Согласно данным литературы, у больных с тяжелой формой COVID-19 наблюдается повышенная экспрессия TLR-9, приводящая к гиперактивации рецептора и, соответственно, к чрезмерной выработке медиаторов воспаления, что лежит в основе цитокинового шторма и тромботических осложнений у пациентов с тяжелыми формами коронавирусной инфекции [2].

С целью определения ассоциации между полиморфизмом гена TLR-9 (-1237)*Т/С и тяжестью течения COVID-19 был проведен анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма гена TLR-9 (-1237)*Т/С в группах больных COVID-19 с различными клиническими формами заболевания. Были рассмотрены больные с тяжелой, средней и легкой формами заболевания. Результаты представлены в таблице 2.

В результате анализа обнаружено, что у больных с легкой формой чаще встречался генотип TLR-9 (-1237)*Т/Т в сравнении с больными с более тяжелыми формами. Различия были достоверны на уровне тенденции в сравнении с больными со средней формой (86 364% и 66 000% соответственно $\chi^2 = 3,158$, $p = 0,076$). TLR-9 (-1237)*Т/Т. По данным литературы, данный генотип связан с

низким уровнем IL-6 в плазме крови. Также известно, что IL-6 играет важную роль в развитии цитокинового шторма у больных с тяжелой формой COVID-19 и высокие уровни IL-6 в плазме крови могут являться фактором развития более тяжелых исходов при COVID-19 [9].

Заключение

Наши результаты подтверждают теорию о том, что генетические различия определяют развитие и течение различных форм COVID-19 у русских Челябинской области. Вероятно, более высокий риск развития заболевания ассоциирован с аллелем TLR-9 (-1237)*С и его гомозиготным генотипом TLR-9 (-1237)*С/С, связанным с более высокой транскрипционной активностью TLR-9. У больных, имеющих в генотипе TLR-9 (-1237)*Т/Т, связанный со средней продукцией TLR-9, большая вероятность развития более легких форм заболевания. Поиск эффективных генетических биомаркеров развития коронавирусной инфекции может быть использовано для разработки методик лечения и предупреждения распространения COVID-19 у русских Челябинской области.

Список литературы / References

1. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Мироншиченкова А.М., Ганковский В.А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Человек и его здоровье, 2012. № 2. С. 147-153. [Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Mironshichenkova A.M., Gankovskii, V.A. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Chelovek i ego zdorovye = Man and His Health*, 2012, no. 2, pp. 147-153. (In Russ.)]
2. Шелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В. COVID-19: этиология, клиника, лечение // Инфекция и иммунитет, 2020. № 10(3). С. 421-445. [Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kruzchkova I.S., Maleev V.V. COVID-19: etiology, clinic, treatment. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, no. 10 (3), pp. 421-445. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CEC-1473.
3. Alhabibi A.M., Hassan A.S., Elbaky N.M., Eid H.A. Impact of Toll-Like Receptor 2 and 9 Gene Polymorphisms on COVID-19: Susceptibility, Severity, and Thrombosis. *J. Inflamm. Res.*, 2023, no. 16, pp. 665-675.
4. Al-Khatib S., Shabaneh A.M., Abdo N., Al-Eitan L. Association of TLR9-1237T>C; rs5743836 polymorphism with increased risk of Hodgkin's lymphoma: A case-control study. *PLoS One*, 2022, Vol. 17, no. 7, e0272312. doi: 10.1371/journal.pone.0272312.
5. Bezemer G., Garssen J. TLR9 and COVID-19: A multidisciplinary theory of a multifaceted therapeutic target. *Front. Pharmacol.*, 2021, Vol. 11, 601685. doi: 10.3389/fphar.2020.601685.
6. Costa T.J., Potje S.R., Fraga-Silva T.F.C., da Silva-Neto J.A., Barros P.R., Rodrigues D., Machado M.R., Martins R.B., Santos-Eichler R.A., Benatti M.N., de Sá K.S.G., Almado C.E.L., Castro Í.A., Pontelli M.C., La Serra L., Carneiro F.S., Becari C., Louzada-Junior P., Oliveira R.D.R., Zamboni D.S., Arruda E., Auxiliadora-Martins M., Giachini F.R.C., Bonato V.L.D., Zachara N.E., Bomfim G.F., Tostes R.C. Mitochondrial DNA and TLR9 activation contribute to SARS-CoV-2-induced endothelial cell damage. *Vascul. Pharmacol.*, 2022, Vol. 142, 106946. doi: 10.1016/j.vph.2021.106946.
7. Greene J.A., Moormann A.M., Vulule J., Bockarie M.J., Zimmerman P.A., Kazura J.W. Toll-like receptor polymorphisms in malaria-endemic population. *Malar. J.*, 2009, Vol. 8, 50. doi: 10.1186/1475-2875-8-50.

8. Gusev E., Sarapultsev A., Solomatina L., Chereshev V. SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.

9. Yang H.-Y., Lu K.-C., Lee H.-S., Huang S.-M., Lin Y.-F., Wu C.-C., Salter D.M., Su S.-L. Role of the functional Toll-like receptor-9 promoter polymorphism (-1237T/C) in increased risk of end-stage renal disease: A case-control study. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 3, e58444. doi: 10.1371/journal.pone.0058444.

Авторы:

Беляева С.В. — к.б.н., биолог отдела лабораторной диагностики, лаборатория диагностики гемотрансмиссивных инфекций ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови»; доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Суслова Т.А. — к.м.н., доцент, заведующая лабораторией иммунологических исследований ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови»; доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Сташкевич Д.С. — к.б.н., доцент, декан биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Баландина С.Э. — ассистент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета, аспирант биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Мякотина Д.Э. — магистрант биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Милонченко М.С. — бакалавр биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Authors:

Belyaeva S.V., PhD (Biology), Biologist, Department of Laboratory Diagnostics, Laboratory for Diagnostics of Bloodborne Infections, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station; Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Suslova T.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunological Research, Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station; Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Stashkevich D.S., PhD (Biology), Associate Professor, Dean, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Balandina S.E., Assistant Professor, Postgraduate Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Myakotina D.E., Master Student, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Milonchenko M.S., Bachelor, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation