



<https://doi.org/10.24060/2076-3093-2020-10-4-302-310>

Вероятные механизмы патогенеза COVID-19

Мустафин Рустам
Наилевич —
к.б.н., кафедра медицинской
генетики и фундаментальной
медицины,
orcid.org/0000-0002-4091-382X

Хуснутдинова Эльза
Камилева —
д.б.н., профессор,
orcid.org/0000-0003-2987-3334

Р.Н. Мустафин^{1}, Э.К. Хуснутдинова²*

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

* **Контакты:** Мустафин Рустам Наилевич, e-mail: ruji79@mail.ru

Аннотация

Обзорная статья посвящена поиску инновационных направлений в исследовании вирусной инфекции COVID-19 для улучшения методов вакцинопрофилактики и лечения болезни. В настоящее время получены убедительные данные о способности ретровирусных РНК-вирусов, в том числе реплицирующихся в цитоплазме, интегрировать фрагменты своих геномов в ДНК хозяев. Это обеспечивается благодаря обратной транскриптазе и интегразе эндогенных ретроэлементов и приводит к персистенции ретровирусных РНК-вирусов за счет экспрессии вирусных белков геномом хозяина, что может служить необходимым условием для поддержания жизнедеятельности вирусов. Интеграционные события играют роль в развитии иммунологического ответа организма и в защитных противовирусных реакциях с помощью системы РНК-интерференции. Данные механизмы могут зависеть от филогенетически древних остатков последовательностей ретровирусных РНК-вирусов в геномах животных. Обнаружение фрагментов SARS-CoV-2 у выздоровевших от COVID-19 позволяет сделать предположение о том, что в патогенезе болезни могли бы играть роль события встройки кДНК фрагментов генома вируса SARS-CoV-2 в геном человека с использованием белков эндогенных ретроэлементов. Подтверждением могут служить данные о развитии у пожилых пациентов преимущественно тяжелых форм COVID-19 с гиперактивностью иммунных реакций, несмотря на их снижение при старении, что может быть обусловлено возрастной аномальной активацией ретроэлементов, которые способствуют обратной транскрипции и встройке экзогенных вирусов. В пользу данного предположения говорят данные о наличии компонентов коронавируса в ядрах инфицированных клеток и об изменении экспрессии LINE-1 в клетках легочной ткани больных SARS. В связи с вероятной ролью ретроэлементов в патогенезе COVID-19 в качестве перспективных направлений лечения COVID-19 могут быть предложены ингибиторы обратной транскриптазы LINE-1 и таргетная терапия с использованием микро-РНК.

Ключевые слова: встройка, коронавирус, обратная транскриптаза, ретроэлементы, SARS-CoV-2, COVID-19, регуляция геной экспрессии, генетическая рекомбинация, РНК вирусы, микро-РНК, таргетная терапия

Для цитирования: Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Вероятные механизмы патогенеза COVID-19. Креативная хирургия и онкология. 2020;10(4):302–310. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2020-10-4-302-310>

Probable Mechanisms of COVID-19 Pathogenesis

Rustam N. Mustafin^{1*}, Elza K. Khusnutdinova²

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

² Institute of Biochemistry & Genetics of Ufa Science Centre of the RAS, Ufa, Russian Federation

* **Correspondence to:** Rustam N. Mustafin, e-mail: ruji79@mail.ru

Rustam N. Mustafin —
Cand. Sci. (Biol.), Department
of Medical Genetics and Funda-
mental Medicine,
orcid.org/0000-0002-4091-382X

Elza K. Khusnutdinova —
Dr. Sci. (Biol.), Professor,
orcid.org/0000-0003-2987-3334

Abstract

This review paper focuses on the search for innovative directions in the study of COVID-19 viral infection with the purpose of improving the methods of its treatment and vaccination. Thus far, comprehensive data have been obtained on the ability of nonretroviral RNA viruses, including those replicated in the cytoplasm, to integrate fragments of their genomes into the host DNA. This mechanism provided by the reverse transcriptase and integrase of endogenous retroelements leads to the persistence of nonretroviral RNA viruses through the expression of viral proteins by the host genome, which may serve as a prerequisite for the survival of such viruses. DNA integration events play a role in the development of both the immunological response and protective antiviral responses through the RNA interference system. These mechanisms may depend on the phylogenetically ancient fossils of nonretroviral RNA sequences in animal genomes. The discovery of SARS-CoV-2 fragments in COVID-19 recovered patients suggests that the pathogenesis of this disease may be associated with the integration of SARS-CoV-2 genome fragments in the human genome by means of proteins of endogenous retroviral elements. This assumption can be confirmed by the data about the development in older patients of predominantly severe forms of COVID-19 with “hyperactive” immune reactions, which normally weaken with ageing. This may be attributed to age-related abnormal activation of retrocells, which contribute to reverse transcription and integration of exogenous viruses. This assumption is supported by the presence of coronavirus components in the nuclei of infected cells and the change in the expression of LINE-1 in the lung tissue cells of SARS patients. Due to the probable role of retrocells in the COVID-19 pathogenesis, LINE-1 reverse transcriptase inhibitors and targeted therapy using microRNAs may be offered as promising treatments for COVID-19.

Keywords: integration, coronavirus, reverse transcriptase, retrocells, SARS-CoV-2, COVID-19, gene expression regulation, genetic recombination, RNA viruses, microRNAs, targeted therapy

For citation: Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Probable Mechanisms of COVID-19 Pathogenesis. *Creative Surgery and Oncology*. 2020;10(4):302–310. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2020-10-4-302-310>

Введение

История коронавируса человека началась в 1966 году, когда Turrell и Вупое описали переживаемый вирус, названный ими B814. Он был получен из респираторного тракта взрослых людей, больных простудой, при выращивании вируса в клеточных культурах эмбриональной трахеи [1]. В дальнейшем под руководством Turrell была изучена группа вирусов человека и животных, которые вызывали разнообразные заболевания. Эти вирусы были объединены в одну группу в связи с характерным внешним видом при электронной микроскопии (выступы на поверхности, напоминающие корону) и наличием РНК [2]. Сероэпидемиологические исследования, проведенные в 1962–1964 и в 1965–1966 годах, показали, что коронавирусы (CoVs) могут вызывать до 30 % всех острых респираторных вирусных инфекций [3]. В 2002–2003 годах CoVs стали причиной развития тяжелого острого респираторного синдрома SARS (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), вызванного SARS-CoV. В ходе эпидемии SARS было выявлено около 8000 больных людей, из которых 774 умерло (9,6 %) [4]. В сентябре 2012 года ВОЗ впервые доложила о новой коронавирусной зооантропонозной инфекции MERS (Middle East respiratory syndrome), вызванной MERS-CoV, на Ближнем Востоке (около 80 % случаев — в Саудовской Аравии). MERS была зарегистрирована в 27 странах. По состоянию на 31 июля 2019 года ВОЗ зарегистрировала 2458 лабораторно подтвержденных случаев MERS, летальность от которых составила 34 % [5].

В декабре 2019 года в городе Ухань провинции Хубэй в Китае произошла вспышка пневмонии, эпидемиологически связанная с оптовым рынком морепродуктов Хуанань, где продавались живые живот-

ные (закрыт 1 января 2020 года). Были исключены такие инфекции, как грипп, птичий грипп, MERS, SARS и другие. Исследователи из Китая 7 января 2020 года выявили и секвенировали геном нового вируса, полученного от инфицированного человека. 12 января 2020 года в международной базе данных Genbank для всего мира стала доступной нуклеотидная последовательность (НП) нового вируса [6], который, согласно Международному комитету по таксономии вирусов (ICTV) был назван SARS-CoV-2 (www.ictvonline.org). Природным резервуаром SARS-CoV-2 могут служить летучие мыши, такие как *Rhinolophus affinis* [7]. Эти данные были получены на основании сравнительного филогенетического анализа вируса с другими CoVs, показавшего, что новый вирус на 96 % идентичен SARS-подобным CoVs летучих мышей (*bat-SL-CoVZK45* и *bat-SL-CoVZK21*). Однако пока точно не установлено — благодаря какому промежуточному хозяину вирус смог преодолеть межвидовой барьер для заражения людей [8]. Вирус SARS-CoV-2 является причиной развития новой болезни, названной COVID-19, которая быстро распространилась по всему миру [7], в связи с чем 19 марта 2020 года ВОЗ объявила о глобальной пандемии COVID-19 (who.int/ru).

Согласно Международному комитету по таксономии вирусов, CoVs являются членами семейства *Coronaviridae* отряда *Nidovirales*. Они относятся к крупнейшим из известных вирусов с одноцепочечной «плюс-нитевой» РНК. Диаметр их сферических частиц составляет от 100 до 160 нм, а размер генома — от 27 до 32 т.п.н. В соответствии с геномной организацией и филогенетическими связями подсемейство *Orthocoronavirinae* подразделено на 4 рода: *Alphacoronavirus* (α-CoV), *Betacoronavirus* (β-CoV), *Gammacoronavirus* (γCoV) и *Deltacoronavirus* (δ-CoV). Из них к α-CoV относятся *Alphacoronavirus 1*, *Human coronavirus 229E*, *Human coronavirus NL63*, *Miniopterus bat coronavirus 1*, *Miniopterus bat coronavirus HKU8*, *Porcine epidemic diarrhea virus*, *Rhinolophus bat coronavirus HKU2*, *Scotophilus bat coronavirus 512*. Они вызывают желудочно-кишечные расстройства у человека, собак, кошек и свиней. Представителями β-CoV являются *Betacoronavirus 1*, *Human coronavirus HKU1*, *Murine coronavirus*, *Pipistrellus bat coronavirus HKU5*, *Rousettus bat coronavirus HKU9*, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. Они инфицируют только млекопитающих. Вирусы рода γCoV и δ-CoV вызывают болезни у птиц, к δ-CoV относятся *Andecovirus*, *Buldecovirus*, *Herdecovirus*; γCoV включают виды *Brangacovirus*, *Cegacovirus*, *Igacovirus*. Основным природным резервуаром α-CoV и β-CoV являются летучие мыши [9, 10].

Было подтверждено высокое сходство (более 99 %) всех известных секвенированных геномов SARS-CoV-2 [10], которые более чем на 70 % сходны с SARS-CoV [6] и в меньшей степени — с MERS-CoV. У человека рецептором для SARS-CoV-2 и SARS-CoV является ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа (ACE2). Однако SARS-CoV-2 связывается с ним слабее, чем SARS-CoV, что соответствует менее тяжелой инфекции. Кроме того, SARS-CoV содержит белок, кодируемый ORF3B,

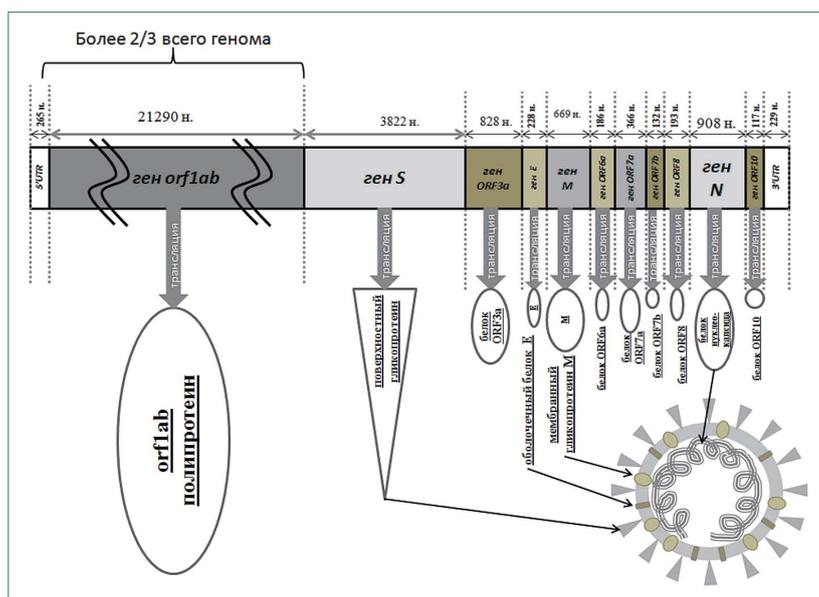


Рисунок 1. Схема строения генома SARS-CoV-2 (длина гена *orf1ab* условно срезана в связи со значительно большими размерами в сравнении с другими генами) по данным [11]
Figure 1. A scheme of the SARS-CoV-2 genome (the length of the *orf1ab* gene was shortened due to its much larger size compared to other genes), according to [11]

который ингибирует экспрессию IFN β [8]. Размер генома SARS-CoV-2 29,8 — 29,9 т.п.н., а его структура соответствует специфическим характеристикам известных CoV (рис. 1).

Более чем 2/3 генома SARS-CoV-2 на 5'-конце представлено ORF1AB (кодирует orf1-ab-полипротеины). Оставшаяся 1/3 генома вируса на 3'-конце состоит из генов, кодирующих структурные белки: нуклеокапсидные (N), мембранные (M), оболочечные (E) и поверхностные (S). Кроме того, SARS-CoV-2 кодирует 6 дополнительных белков при помощи генов ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b и ORF8 [11]. Продукт трансляции orf1ab (pp1ab) расщепляется на 16 неструктурных белков, которые участвуют в транскрипции и репликации вируса. По составу кодирующих специфические белки генов α -CoV, β -CoV, γ -CoV и δ -CoV несколько отличаются (рис. 2). Наиболее варибельными генами SARS-CoV являются гены S и orf8 [9].

Гликопротеин шипа (белок S) выполняет функцию связывания с клеточным рецептором ACE2, посредством чего притягивает вирус к клетке, чем способствует проникновению вируса в клетку [7]. Оба конца геномов CoVs складываются в структуры РНК высокого порядка, которые участвуют во взаимодействиях с вирусными и клеточными белками для управления трансляцией, репликацией и синтезом субгеномной РНК [12]. Например, с 5'-UTR генома вируса SARS-CoV связываются структурные домены клеточных белков, такие как цинковый палец ССНС-типа и РНК-связывающий мотив 1 (MADP1). Важная роль MADP1 белка в синтезе коронавирусной РНК была выявлена при помощи siРНК, интерферирующих с MADP1 [13].

По физико-химическим свойствам SARS-CoV-2 чувствительны к ультрафиолетовым лучам и нагреванию при 56 °C в течение 30 минут, эфиру, 75 % этанолу, хлорсодержащим дезинфицирующим средствам, перекисной кислоте, хлороформу и другим жирорастворимым соединениям [8]. Отличительными симптомами COVID-19 являются сухой кашель, высокая температура и утомляемость. Инкубационный период болезни составляет в среднем от 5 до 6 дней, но может варьировать, в зависимости от дозы заражения, от 1 до 14 дней [14]. Поражение желудочно-кишечного тракта может наблюдаться у половины больных и ассоциировано с худшим исходом. Сухой кашель наблюдается у 68 % пациентов, лихорадка — у 44 %, одышка — у 19 %, боль в горле — у 15 %, диарея — 3–3,8 %. Тяжелое течение наблюдается главным образом у пожилых людей и страдающих сопутствующими гипертонией, диабетом, ожирением, бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких [15].

Помимо тяжелых форм, приводящих к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС), характерно бессимптомное течение у вирусносителей COVID-19 [16]. Кроме того, у больных после выздоровления обнаруживаются положительные результаты на SARS-CoV-2 через 7 [17] и даже 14 дней не только в образцах из дыхательной системы, но и в фекалиях [18]. Данное явление можно объяснить вероятными встройками кДНК

фрагментов генома вируса SARS-CoV-2 в геном человека. Это предположение основано на том, что обнаружение последовательностей неретровирусных РНК-вирусов (NRRV) у организмов, перенесших вирусную инфекцию, связано с интеграцией фрагментов патогенов в геном хозяина [19–21].

О существовании независимого от репликации механизма рекомбинации РНК было сделано предположение еще в 2004 году Gallei et al. в эксперименте *in vivo* на клеточной культуре бычьей почки с субгеномными транскриптами плюс-нитевого вируса диареи крупного рогатого скота (BVDV) семейства *Flaviviridae* рода *Pestivirus*. Гомологичная и негомологичная рекомбинация происходила между двумя перекрывающимися транскриптами, в каждом из которых отсутствовали гены РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) [22]. Дальнейшие эксперименты *in vivo* с использованием BVDV показали, что большинство сайтов рекомбинации расположены в одноцепочечных областях молекул РНК. Вероятно, для высоковарибельных РНК-вирусов рекомбинация вносит значительный вклад в их генетические вариации, которые могут привести к изменениям вирулентности, адаптации к новым хозяевам, способности избежать иммунного ответа хозяина и появлению новых инфекционных агентов [23]. Можно предположить, что подобные механизмы могли стать причиной возникновения нового вируса SARS-CoV-2 из других коронавирусов.

Встройки фрагментов неретровирусных РНК-вирусов в геномы хозяев

Еще в 1975 году отечественный вирусолог В.М. Жданов обнаружил, что ДНК-транскрипты инфекционных РНК-вирусов встраиваются в геномы клеток

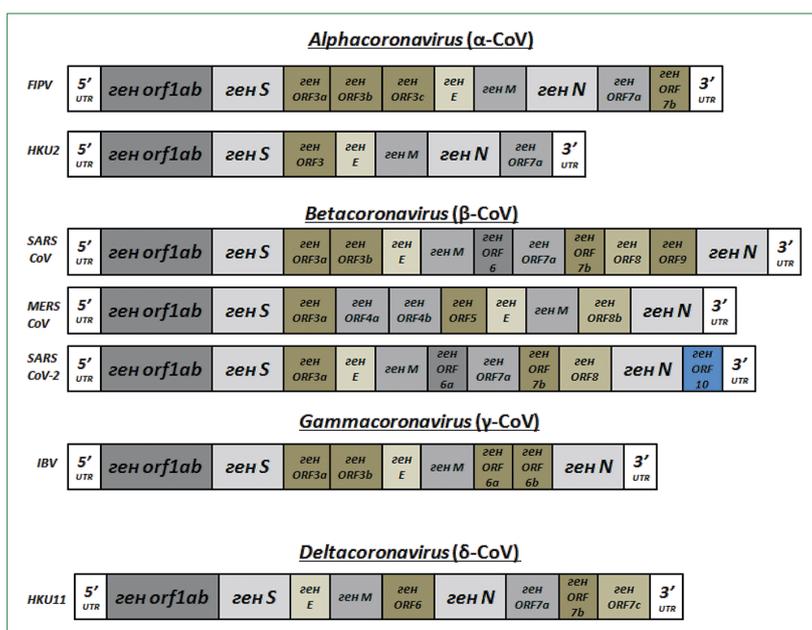


Рисунок 2. Схема строения геномов представителей разных родов коронавирусов. По данным [9, 11]
 Figure 2. A scheme of the genomes of different coronavirus genera, according to [9, 11]

хронически инфицированных тканевых культур. Кроме того, в тканях людей, пораженных системной красной волчанкой, были выявлены последовательности ДНК, гомологичные РНК вируса кори [24]. В 1997 году Kleenerman et al. при изучении инфекции, вызванной РНК-вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), показал, что вирусные антигены могут персистировать в лимфоидной ткани в течение фазы иммунологической памяти. Но при этом РНК генома вируса не обнаруживается. Однако при помощи ПЦР были выявлены специфические для LCMV последовательности ДНК в клетках селезенки мышей через 200 дней после заражения. Было доказано, что обратная транскрипция вирусной РНК в комплементарную ДНК (кДНК) происходит после острой инфекции клеток ее естественных хозяев за счет эндогенной активности обратной транскриптазы (RT) хозяев [25]. В 2009 году Geuking et al. в экспериментах на мышах описали незаконную рекомбинацию между РНК вируса LCMV и эндогенной частицей ретроэлемента (РЭ) IAP (Intracisternal A-type Particle) с обратной транскрипцией экзогенной вирусной РНК. В результате кДНК интегрировала в геном хозяина при помощи IAP элемента [26]. В разное время после инфекции в клетках человека (293Т) были выявлены кДНК вируса везикулярного стоматита (NRRV семейства *Rhabdoviridae*), образованные при помощи белков LINE-1 элемента клеток [27].

Фрагменты ДНК последовательностей NRRV арбовирусов были обнаружены в клетках комаров на ранней стадии инфекции в виде эписомных форм ДНК. По данным секвенирования нового поколения и биоинформационного анализа было доказано, что эти НП интегрированы в геном хозяев. Данное явление, как предполагается, связано с вирусной персистенцией и иммунным ответом хозяина [20]. Встройка фрагментов вирусных НП может привести к хронической инфекции. Однако клетки животных могут извлекать выгоду от инсертированных в их геномы НП вирусов, например для управления развитием клеток хозяев или для сайленсинга чужеродных инвазий и поддержания иммунной памяти. Клетки хозяев могут экспрессировать вирусные пептиды из открытых рамок считывания интегрированных вирусных НП для усиления адаптивных В- и Т-клеточных ответов в течение длительного времени после освобождения организма от реплицирующихся вирусов. Подтверждением этого является то, что для вирусов, которые заражают остро (ортомиксовирусы и вирус коровьей оспы), характерна последующая необъяснимо длительная персистенция вирусных НП и пептидов с наличием вирус-специфического адаптивного иммунитета [19]. Было доказано, что образованные в результате встроек кДНК фрагментов генома вируса эндогенные вирусные элементы (EVE) могут функционировать в качестве шаблонов для биогенеза PIWI-взаимодействующих РНК (piРНК) у комаров и 48 видов членистоногих, что говорит о роли EVE в формировании иммунологической памяти. Эти EVE соответствуют в основном одноцепочечным NRRV семействам *Rhabdoviridae* и *Parvoviridae* [21].

Доказательствами интегративной способности фрагментов NRRV являются также данные филогенетических исследований. В 2004 году Crochu et al. выявили мультигенную последовательность флави-вируса в геноме комаров *Aedes albopictus* и *Aedes aegypti* [28]. В 2010 году Katzourakis и Gifford провели скрининг геномов животных *in silico* для идентификации EVE, происходящих от NRRV. Было выявлено множество EVE, происходящих от представителей семейства *Bornaviridae* и *Filoviridae* у млекопитающих, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae* у насекомых. Из них *Filoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* и *Flaviviridae*, подобно коронавирусам, реплицируются в цитоплазме [29]. В геномах человека и других приматов, а также у грызунов и слонов были выявлены элементы, гомологичные нуклеопротеину (N) вирусов семейства *Bornaviridae*. Эти EVE, обозначенные как EBLN (endogenous Borna-like N elements), могут содержать интактную ORF и экспрессируются в виде мРНК хозяев. Филогенетический анализ показал, что EBLN были образованы различными инсерционными событиями для каждого семейства животных на разных этапах эволюции [30]. В 2010 году Teylor et al. представили прямые доказательства наличия EVE, происходящих от реплицирующихся вне ядра представителей семейства *Filoviridae*, в геномах летучих мышей, грызунов, тенреков, землеройковых и сумчатых [31]. В том же году Belyi et al. провели сравнительный анализ 5666 генов всех известных семейств одноцепочечных NRRV с геномами 48 видов позвоночных. Было доказано происхождение 80 EVE (возникших около 40 миллионов лет назад) от фрагментов геномов древних членов 4 циркулирующих в настоящее время семейств вирусов у 19 изученных видов позвоночных. Интеграция была показана в том числе для «плюс-нитевых» одноцепочечных РНК-вирусов семейства *Flaviviridae*, реплицирующихся в цитоплазме [32], подобно коронавирусам.

Вероятность встройки кДНК фрагментов вируса SARS-CoV-2

Вышеперечисленные данные о встройках кДНК фрагментов NRRV в геномы хозяев и даже их сохранении в эволюции позволяют сделать предположение о наличии сходных свойств у SARS-CoV-2. Косвенными подтверждениями данного предположения могут служить специфические особенности CoVs и вызванных ими заболеваний. Так, при исследовании коронавирусной инфекции ЦНС у мышей Bergmann et al. еще в 2006 году показали персистенцию CoV, несмотря на наличие врожденного иммунного ответа и специфических эффекторных механизмов хозяина, контролирующих репликацию вируса в различных типах клеток головного мозга [33]. Так как в персистенции NRRV может играть роль интеграция вируса в геном хозяев [20], можно предположить, что хроническая инфекция CoV у мышей обусловлена встройкой кДНК фрагментов генома вируса. В пользу этого говорят также факты интеграции фрагментов геномов плюс-нитевых РНК-вирусов, реплицирующихся, подобно CoVs, в цитоплазме [29, 32].

Было проведено подробное изучение последовательностей SARS-CoV-2, других коронавирусов и HIV-1, с использованием базы данных GenBank. В результате выявлены специфические встройки кДНК фрагментов генома вируса, идентичные или высокоомологичные генам хозяев (млекопитающих и насекомых) [34]. Эти НП могли быть получены путем встраивания фрагментов последовательностей CoV в геномы хозяев с использованием белков РЭ хозяев и сохранением их в ходе эволюции, подобно другим NRRV [27–31]. Образованные вставки способны генерировать вирусные РНК с измененными последовательностями, которые способны использоваться для рекомбинации при коронавирусной инфекции, что может объяснить возникновение новых разновидностей вируса, в том числе SARS-CoV-2. Одним из фактов, позволяющих сделать это предположение, является обнаружение частиц CoVs в ядрах пораженных клеток [35–38].

Еще в 2004 году Qinfen et al. при изучении жизненного цикла SARS-CoV в клетках почек африканских зеленых маргтышек выявили специфический феномен образования вирусоподобных частиц в ядрах инфицированных клеток [35]. В последующих исследованиях была доказана локализация различных компонентов CoVs в ядрах пораженных клеток. Так, белок 3b SARS-CoV располагается преимущественно в ядре совместно с важными белками ядрышка (C23) [37]. В исследовании Matthews et al. в 2014 году при определении субклеточной локализации белковых продуктов ORF4b (p4b) вирусом MERS-CoV, BtCoV-HKU4 и BtCoV-HKU5 было показано их расположение в ядрах клеток. Вспомогательный белок p4b участвует в защите от врожденного иммунитета путем ингибирования путей передачи сигналов интерферона-1 и NF-κB [38]. Белок 9b вируса SARS-CoV, способный проникать в ядро посредством пассивного транспорта независимо от клеточного цикла, взаимодействует с клеточным белком Crm1 и выходит из ядра при помощи активных сигналов ядерного экспорта, при дефиците которых белок 9b индуцирует апоптоз клеток [39].

Белок N различных коронавирусов, в том числе SARS-CoV, также локализуется не только в цитоплазме, но и в ядрах пораженных клеток [36]. Было показано, что белок N вируса SARS-CoV посредством специфического домена связывается с гетерогенным ядерным рибонуклеопротеином A1, который участвует в сплайсинге пре-мРНК в ядрах и в регуляции трансляции в цитоплазме [40]. Можно предположить, что в развитии противовирусного ответа на SARS-CoV-2 определенную роль могут играть индивидуальные особенности состава и распределения РЭ, а также состояние их активности в геноме больных людей, так как RT и интеграза ретроэлементов могут участвовать во встраивании коронавирусов в геном человека. С этим можно связать тяжелое течение COVID-19 у пожилых пациентов [8], так как при старении наблюдается патологическая активация РЭ [41]. Кроме того, у больных SARS одним из целевых аутоантигенов оказалась эндонуклеаза (EN) ретроэлемента LINE-1, экспрессия которого

была измененной в легочной ткани пораженных людей. Антитела против EN были выявлены у 40,9 % пациентов с SARS [42]. Не исключено развитие подобных механизмов для COVID-19.

Взаимодействие коронавирусов с иммунной системой человека

SARS-CoV-2 заражает эпителиальные клетки альвеол легких при помощи рецептор-опосредованного эндцитоза через ACE2 [43]. Вирус проходит через слизистую оболочку носа и гортани, далее через дыхательные пути проникает в легкие, из которых проникает в периферическую кровь, вызывая вирусемия. В результате SARS-CoV-2 может поражать целевые органы, экспрессирующие ACE2, такие как сердце, почки, желудочно-кишечный тракт и вторично легкие [14]. Белок S стимулирует воспалительные реакции посредством активации toll-подобных рецепторов 2 (TLR2). Белок E является виропоринном и усиливает активность инфламмосомы NLRP3, приводя к гиперпродукции IL-1β и развитию иммунопатологии хозяина [12]. Тяжелое течение болезни может быть обусловлено патологическим иммунным ответом, «цитокиновым штормом», при котором высвобождение медиаторов воспаления инициирует петлю положительной обратной связи, приводящей к ОРДС. У больных COVID-19, нуждающихся в интенсивной терапии, выявляются значительно более высокие уровни маркеров воспаления IL-2, IL-7, IL-10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1, TNF-alpha. При тяжелом течении COVID-19 и в тканях легких умерших больных определяется чрезмерно активированный иммунный ответ с патогенными Th1 лимфоцитами и моноцитами [15]. При этом наблюдается аномальная выработка интерферонов с высокими уровнями провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8 и CXCL-10, в легких [12].

При проникновении в организм хозяина вирус вначале распознается врожденной иммунной системой через специфические рецепторы PRRs (pattern recognition receptors), в том числе лектиноподобные рецепторы C-типа, toll-подобный (TLR3, TLR4), RIG-I-подобный (индуцируемый ретиноевой кислотой), MDA-5 (ассоциированный с дифференцировкой меланом белок 5) и NOD-подобный рецепторы. Активация сенсоров приводит к стимуляции регуляторных факторов интерферонов IRF3 и IRF7, а также NF-κB. Они стимулируют экспрессию и выработку интерферона I типа и провоспалительных цитокинов, которые активируют сигнальный каскад JAK-STAT, индуцирующий экспрессию множества противовирусных интерферон-стимулированных генов [8, 12].

Инфекционный процесс при коронавирусной инфекции имеет много неразрешенных моментов, так как, несмотря на развитие гиперактивности иммунной системы с развитием «цитокинового шторма», CoVs противодействуют защитным механизмам хозяев различными путями. Так, белок N вируса SARS-CoV может использоваться вирусом для уклонения от иммунных реакций хозяина [8]. CoVs используют

стратегии для противодействия PKR-опосредованной передаче сигналов, чтобы предотвратить отключение трансляции из-за фосфорилирования eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 α). Белки S вируса SARS-CoV физически взаимодействуют с eIF3F (eukaryotic translation Initiation factor 3 subunit F), модулируя трансляцию хозяина, в том числе экспрессию провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8, на поздней стадии инфекции. Кроме того, nsr1 блокирует передачу сигналов интерферона путем снижения количества фосфорилированных STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) в инфицированных клетках. Продукты ORF3b и ORF6 вируса SARS-CoV блокируют экспрессию и передачу сигналов интерферона. Белки M связываются с TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3) и предотвращают его связывание с TBK1 (TANK-binding kinase 1). В результате блокируется IRF3-опосредованная передача сигналов [12]. Вспомогательный белок 6 вируса SARS-CoV характеризуется взаимодействием с внутриклеточными мембранными структурами клеток и за счет высокой полярности 20 остатков аминокислот на его С-конце препятствует транспорту сигнальных белков, необходимых для врожденных иммунных реакций. Это обеспечивается путем взаимодействия С-конца с карбоферинами KPNB1 и KPNB2 [44].

Перспективы исследований COVID-19

Несмотря на интенсивное изучение SARS-CoV-2, в настоящее время не разработана эффективная кандидатная вакцина и специфическая противовирусная терапия COVID-19. В настоящее время проводится множество клинических исследований различных потенциальных противовирусных препаратов. Необходимо отметить, что экспериментальные препараты для лечения COVID-19 следует использовать только в утвержденных рандомизированных контролируемых исследованиях <https://clinicaltrials.gov/> (apps.who.int). В данном отношении предполагается дальнейшее исследование возможности применения и исследования эффективности аналогов нуклеозидов (ремдисивир), пептида ЕК1, ингибиторов нейраминидазы и синтеза РНК (ТДФ, ЗТС), а также противовоспалительных препаратов [45]. Предсказана также вероятность использования препаратов, подавляющих проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени. К ним относится барицитиниб, который используется для лечения ревматоидного артрита и является ингибитором киназы AAK1. Возможный эффект связан с тем, что AAK1 ассоциирована с AP2 (Adaptor protein complex 2) и ее подавление препятствует рецептор-опосредованному эндоцитозу CoV через рецептор ACE2 [43]. Большое значение имеет разработка терапии с учетом патогенеза тяжелых форм, при которых развивается «цитокиновый шторм». В данном отношении возможно применение глюкокортикоидов для ОРДС при COVID-19, а также проводятся многоцентровые клинические испытания блокатора рецептора IL-6 тоцилизумаба [15]. В связи с предполагаемой ролью встраек кДНК фрагментов генома вируса SARS-CoV-2 в патогенезе

COVID-19 (гиперактивный иммунный ответ у пожилых пациентов [15], вероятно, связанный с повышенной экспрессией РЭ в их геномах [41]) в качестве потенциальных препаратов для лечения COVID-19 могут быть предложены ингибиторы RT, которые эффективно применяются в терапии злокачественных новообразований [46]. Перспективным в лечении COVID-19 может быть таргетная терапия с использованием микро-РНК. В отношении SARS-CoV-2 miR-1307-3p и miR-3613-5p могут предотвращать репликацию вируса путем нацеливания на 3'-UTR его генома [47]. В Индии были определены 9 различных микро-РНК человека, нацеленных на гены SARS-CoV-2: hsa-let-7a, hsa-miR101, -125a-5p, -126, -222, -23b, -378, -380-5, -98. Из них для hsa-let-7a, hsa-miR126, hsa-miR378 и hsa-miR98 мишенью оказался также ген *IFN β* в организме человека [48].

К наиболее успешным кандидатным вакцинам, прошедшим в клиническую разработку, относятся мРНК-1273 (LNP-инкапсулированная мРНК, кодирующая белок S), Ad5-nCoV (аденовирусный вектор-5, экспрессирующий белок S), INO-4800 (ДНК-плазмида, кодирующая белок S), LV-SMENP-DC (дендритные клетки, модифицированные лентивирусным вектором, экспрессирующим миниген на основе доменов вирусных белков), патоген-специфичная aAPC (искусственная антигенпрезентирующая клетка, модифицированная лентивирусным вектором, экспрессирующим синтетический миниген на основе доменов вирусных белков) [49]. Приведенные в статье данные о способности NRRV к интеграциям в геномы хозяев позволяют предположить, что при использовании вакцины от COVID-19 необходимо учитывать возможность встраек кДНК фрагментов вируса в геном человека [23, 25, 26].

Заключение

Анализ литературных данных о роли интеграции вирусных фрагментов в инфекционных процессах NRRV позволил предположить, что в развитии COVID-19 определенную роль могут играть индивидуальные особенности активности РЭ в геномах больных. Это связано с возможным взаимодействием продуктов их экспрессии с SARS-CoV-2. В качестве подтверждения приведены данные об утяжелении клиники у пожилых пациентов (вероятно, обусловленной патологической активацией РЭ при старении), наличии бессимптомного носительства и сохранении экспрессии вирусных последовательностей даже через 14 дней после выздоровления от COVID-19. Кроме того, у больных SARS выявлено изменение активности LINE-1 и выработка антител против их эндонуклеазы. Взаимодействие SARS-CoV-2 с продуктами экспрессии РЭ могло стать причиной возникновения нового коронавируса в связи с возможной рекомбинацией вирусных и клеточных РНК. Перспективным направлением в исследовании COVID-19 может стать определение наличия и особенностей встраек кДНК фрагментов последовательностей SARS-CoV-2 в геномы вирусоносителей, что может стать основой для разработки эффективной

вакцинопрофилактики болезни. Отражением особенностей функционирования РЭ являются малые не кодирующие РНК, поэтому в разработке подходов противовирусной терапии важную роль могут играть результаты анализа экспрессии микро-РНК при различных клинических вариантах COVID-19 с учетом возможных особенностей встроек кДНК фрагментов вируса SARS-CoV-2 в геномы пациентов с тяжелым течением. В связи с этим предполагается проведение ПЦР-диагностики для обнаружения не только РНК, но и инсертированной ДНК SARS-CoV-2, а также определение противовирусных антител у пациентов в различные периоды после перенесенной инфекции. Одни продукты экспрессии (белки S и E) вирусов активируют воспалительные реакции, в то время как другие (белки N, M, nsр1, nsр6, ORF3b, ORF6) препятствуют развитию иммунных реакций организма. В связи с этим влияние определенных клеточных факторов на преобладание экспрессии специфических генов вируса может определять течение инфекции от стертых форм до тяжелых с развитием «цитокинового шторма». Наиболее интересными клеточными факторами в плане разработки методов лечения COVID-19 являются микро-РНК, изменения экспрессии которых при болезни доказаны. Кроме того, в настоящее время появляются данные о наиболее эффективных терапевтических агентах для лечения COVID-19, к которым относится барицитиниб. Для подавления «цитокинового шторма» применяют нестероидные противовоспалительные препараты и глюкокортикоиды, планируется использование блокатора интерлейкинового рецептора тоцилизумаба.

Информация о конфликте интересов.

Конфликт интересов отсутствует.

Информация о спонсорстве.

Данная работа не финансировалась.

Список литературы / References

- 1 Tyrrell D.A., Bynoe M.L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*. 1966;1:76–7. DOI: 10.1016/s0140-6736(66)92364-6
- 2 Tyrrell D.A., Almeida J.D., Cunningham C.H., Dowdle W.R., Hofstad M.S., McIntosh K., et al. Coronaviridae. *Intervirology*. 1975;5(1–2):76–82. DOI: 10.1159/000149883
- 3 McIntosh K., Kapikian A.Z., Turner H.C., Hartley J.W., Parrott R.H., Chanock R.M. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol*. 1970;91(6):585–92. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121171
- 4 Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L., Guan Y., Yam L.Y., Lim W., et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003;361(9366):1319–25. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)13077-2
- 5 Azhar E.L., Hui D.S.C., Memish Z.A., Drosten C., Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):891–905. DOI: 10.1016/j.idc.2019.08.001
- 6 Hui D.S., Azhar E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis*. 2020;91:264–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.01.009
- 7 Zhang C., Zheng W., Huang X., Bell E.W., Zhou X., Zhang Y. Protein Structure and Sequence Reanalysis of 2019-nCoV Genome Refutes Snakes as Its Intermediate Host and the Unique Similarity between Its Spike Protein Insertions and HIV-1. *J Proteome Res*. 2020;19(4):1351–60. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00129
- 8 Yi Y., Lagniton P.N.P., Ye S., Li E., Xu R.H. COVID-19: what has been learned about the novel coronavirus disease. *Int J Biol Sci*. 2020;16(10):1753–66. DOI: 10.7150/ijbs.45134
- 9 Cui J., Li F., Shi Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181–92. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9
- 10 Ceraolo C., Giorgi F.M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *J Med Virol*. 2020;92(5):522–8. DOI: 10.1002/jmv.25700
- 11 Khailany R.A., Safdar M., Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep*. 2020;19:100682. DOI: 10.1016/j.genrep.2020.100682
- 12 de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. Host factors in coronavirus replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018;419:1–42. DOI: 10.1007/82_2017_25
- 13 Tan Y.W., Hong W., Liu D.X. Binding of the 5'-untranslated region of coronavirus RNA to zinc finger CCHC-type and RNA-binding motif 1 enhances viral replication and transcription. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):5065–77. DOI: 10.1093/nar/gks165
- 14 Lin L., Lu L., Cao W., Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection — a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):727–32. DOI: 10.1080/22221751.2020.1746199
- 15 Giwa A.L., Desai A., Duca A. Novel 2019 coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19): an overview for emergency clinicians. *Pediatr Emerg Med Pract*. 2020;17(5):1–24. PMID: 32286766
- 16 Lai C.C., Liu Y.H., Wang C.Y., Wang Y.H., Hsueh S.C., Yen M.Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(3):404–12. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.02.012
- 17 Li Y., Hu Y., Zhang X., Yu Y., Li B., Wu J., et al. Follow-up testing of viral nucleic acid in discharged patients with moderate type of 2019 coronavirus disease (COVID-19). *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2020;49(1):270–4. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2020.03.11
- 18 Li Y., Hu Y., Yu Y., Zhang X., Li B., Wu J., et al. Positive result of Sars-Cov-2 in faeces and sputum from discharged patient with COVID-19 in Yiwu, China. *J Med Virol*. 2020;92(10):1938–47. DOI: 10.1002/jmv.25905
- 19 Hurwitz J.L., Jones B.G., Charpentier E., Woodland D.L. Hypothesis: RNA and DNA viral sequence integration into the mammalian host genome supports long-term B cell and T cell adaptive immunity. *Viral Immunol*. 2017;30(9):628–32. DOI: 10.1089/vim.2017.0099
- 20 Olson K.E., Bonizzoni M. Nonretroviral integrated RNA viruses in arthropod vectors: an occasional event or something more? *Curr Opin Insect Sci*. 2017;22:45–53. DOI: 10.1016/j.cois.2017.05.010
- 21 Ter Horst A.M., Nigg J.C., Dekker F.M., Falk B.W. Endogenous viral elements are widespread in arthropod genomes and commonly give rise to PIWI-interacting RNAs. *J Virol*. 2019;93(6):e02124–18. DOI: 10.1128/JVI.02124-18
- 22 Gallei A., Pankraz A., Thiel H.J., Becher P. RNA recombination in vivo in the absence of viral replication. *J Virol*. 2004;78(12):6271–81. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6271-6281.2004
- 23 Austermann-Busch S., Becher P. RNA structural elements determine frequency and sites of nonhomologous recombination in an animal plus-strand RNA virus. *J Virol*. 2012;86(13):7393–402. DOI: 10.1128/JVI.00864-12
- 24 Zhdanov V.M. Integration of viral genomes. *Nature*. 1975;256(5517):471–3. DOI: 10.1038/256471a0
- 25 Klenerman P., Hengartner H., Zinkernagel R.M. A non-retroviral RNA virus persists in DNA form. *Nature*. 1997;390:298–301. DOI: 10.1038/36876
- 26 Geuking M.B., Weber J., Dewannieux M., Gorelik E., Heidmann T., Hengartner H., et al. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science*. 2009;323(5912):393–6. DOI: 10.1126/science.1167375
- 27 Shimizu A., Nakatani Y., Nakamura T., Jinno-Oue A., Ishikawa O., Boeke J.D., et al. Characterisation of cytoplasmic DNA complementary to non-retroviral RNA viruses in human cells. *Sci Rep*. 2014;4:5074. DOI: 10.1038/srep05074
- 28 Crochu S., Cook S., Attoui H., Charrel R.N., De Chesse R., Belhouchet M., et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 7):1971–80. DOI: 10.1099/vir.0.79850-0
- 29 Katzourakis A., Gifford R.J. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet*. 2010;6(11):e1001191. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001191

- 30 Horie M., Honda T., Suzuki Y., Kobayashi Y., Daito T., Oshida T., et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature*. 2010;463(7277):84–7. DOI: 10.1038/nature08695
- 31 Taylor D.J., Leach R.W., Bruenn J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol Biol*. 2010;10:193. DOI: 10.1186/1471-2148-10-193
- 32 Belyi V.A., Levine A.J., Skalka A.M. Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate. *PLoS Pathog*. 2010;6(7):e1001030. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001030
- 33 Bergmann C.C., Lane T.E., Stohlman S.A. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(2):121–32. DOI: 10.1038/nrmicro1343
- 34 Xiao C., Li X., Liu S., Sang Y., Gao S.J., Gao F. HIV-1 did not contribute to the 2019-nCoV genome. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):378–81. DOI: 10.1080/22221751.2020.1727299
- 35 Qinfen Z., Jinming C., Xiaojun H., Huanying Z., Jicheng H., Ling F., et al. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Med Virol*. 2004;73(3):332–7. DOI: 10.1002/jmv.20095
- 36 Timani K.A., Liao Q., Ye L., Zeng Y., Liu J., Zheng Y., et al. Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res*. 2005;114(1–2):23–34. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.05.007
- 37 Yuan X., Yao Z., Shan Y., Chen B., Yang Z., Wu J., et al. Nucleolar localization of non-structural protein 3b, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virus Res*. 2005;114(1–2):70–9. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.06.001
- 38 Matthews K.L., Coleman C.M., van der Meer Y., Snijder E.J., Frieman M.B. The ORF4b-encoded accessory proteins of Middle East respiratory syndrome coronavirus and two related bat coronaviruses localize to the nucleus and inhibit innate immune signaling. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 4):874–82. DOI: 10.1099/vir.0.062059-0
- 39 Sharma K., Åkerström S., Sharma A.K., Chow V.T., Teow S., Abrenica B., et al. SARS-CoV 9b protein diffuses into nucleus, undergoes active Crm1 mediated nucleocytoplasmic export and triggers apoptosis when retained in the nucleus. *PLoS One*. 2011;6(5):e19436. DOI: 10.1371/journal.pone.0019436
- 40 Luo H., Chen Q., Chen J., Chen K., Shen X., Jiang H. The nucleocapsid protein of SARS coronavirus has a high binding affinity to the human cellular heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1. *FEBS Lett*. 2005;579:2623–8. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.03.080
- 41 Cardelli M. The epigenetic alterations of endogenous retroelements in aging. *Mech Ageing Dev*. 2018;174:30–46. DOI: 10.1016/j.mad.2018.02.002
- 42 He W.P., Shu C.L., Li B.A., Zhao J., Cheng Y. Human LINE1 endonuclease domain as a putative target of SARS-associated autoantibodies involved in the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(7):608–14. PMID: 18466680
- 43 Richardson P., Griffin I., Tucker C., Smith D., Oechsle O., Phelan A., et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet*. 2020;395:e30–1. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30304-4
- 44 Hussain S., Gallagher T. SARS-coronavirus protein 6 conformations required to impede protein import into the nucleus. *Virus Res*. 2010;153(2):299–304. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.08.017
- 45 Lu H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Biosci Trends*. 2020;14(1):69–71. DOI: 10.5582/bst.2020.01020
- 46 Sciamanna I., Sinibaldi-Vallebona P., Serafino A., Spadafora C. LINE-1 encoded reverse Transcriptase as a target in cancer therapy. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;23:1360–9. DOI: 10.2741/4648
- 47 Chen L., Zhong L. Genomics functional analysis and drug screening of SARS-CoV-2. *Genes Dis*. 2020;7(4):542–50. DOI: 10.1016/j.gendis.2020.04.002
- 48 Sardar R., Satish D., Birla S., Gupta D. Comparative analyses of SARS-CoV2 genomes from different geographical locations and other coronavirus family genomes reveals unique features potentially consequential to host-virus interaction and pathogenesis. *Heliyon*. 2020;6(9):e04658. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04658
- 49 Thanh Le T., Andreadakis Z., Kumar A., Gomez Roman R., Tollefsen S., Saville M., et al. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(5):305–6. DOI: 10.1038/d41573-020-00073-5