

ОСНОВА ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ ЧЕЛОВЕКА – РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Муратходжаев Д.Н., Арипова Т.У.

*Институт иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент,
Республика Узбекистан*

Резюме. Сравнительный анализ механизмов противовирусной защиты простейших и РНК-интерференции многоклеточных организмов выявил не только их сходство, но и дал ключ к пониманию адаптивного иммунитета. Представлены последние данные, подтверждающие роль РНК-управляемой регуляции генов в противовирусной защите человека. Рассмотрена работа интерфероновой системы и роль нейтрализующих антител при вирусной инвазии. Обоснована новая концепция — основой противовирусной защиты всех организмов является внутриклеточные РНК-управляемые механизмы подавления вирусного размножения. Простая и эффективная защита от вирусов состоит в том, что часть ДНК вируса (спейсер) встраивается в геном клетки, и при повторном заражении, РНК-транскрипт этого спейсера направляет ферменты нуклеазы на чужеродный геном. Это настоящая адаптивная противовирусная защита, которой потенциально обладает каждая клетка. Главная цель эволюционно более молодых специализированных иммунных клеток это поддержание целостности и борьба с чужеродными организмами. Основной ролью интерфероновой системы является раннее предупреждение организма о внедрении вируса, с последующим переводом клеток в режим тревоги.

Соответственно, настоящим обретенным противовирусным иммунитетом будут не наличие В- и Т-клеток памяти, не нейтрализующие антитела, а наличие специфических спейсеров в ДНК переболевших людей. Данная статья, описывающая работу этих защитных механизмов, предназначена в первую очередь для широкой медицинской общественности, и практические выводы для врачей следующие:

1. Наличие или отсутствие специфичных антител к SARS-CoV-2 АТ не является прогностическим признаком болезни. Наличие в крови антител лишь отражает факт контакта этого человека с вирусом. Отсутствие антител не говорит об отсутствии контакта, а люди, имеющие высокий титр специфичных антител не защищены от повторной инфекции SARS-CoV-2.
2. ПЦР-тесты. У переболевших COVID-19 тесты могут оставаться «ложно положительными» при условии забора генного материала из мест проникновения вируса. На наш взгляд, правильным показателем отсутствия болезни будут отрицательные тесты ПЦР на COVID-19 плазмы крови и мочи, даже при положительном результате при заборе из носоглотки.
3. Необходимо привлечь внимание врачей к возможному использованию витамина А в профилактике и лечении COVID-19, учитывая важность RLR рецепторов в распознавании вирусных РНК и положительный опыт применения витамина А при другом опасном вирусном заболевании — кори.

Ключевые слова: РНК-интерференция, противовирусный иммунитет, COVID-19, интерфероны, антителозависимое усиление инфекции

Адрес для переписки:

Муратходжаев Джавдат Нариманович
Институт иммунологии и геномики человека
Академии наук Республики Узбекистан
100060, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Яхье Гулямова, 74.
Тел.: +998-93 180-12-87.
E-mail: javdat_m@yahoo.com

Address for correspondence:

Muratkhodjaev Javdat N.
Institute of Immunology and Human Genomics, Academy
of Sciences of the Republic of Uzbekistan
100060, Uzbekistan, Tashkent, Yahye Gulyamov str., 74.
Phone: +998-93 180-12-87.
E-mail: javdat_m@yahoo.com

Образец цитирования:

Д.Н. Муратходжаев, Т.У. Арипова «Основа противовирусной защиты человека — РНК-интерференция» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1065-1074.
doi: 10.15789/1563-0625-RII-2331
© Муратходжаев Д.Н., Арипова Т.У., 2022

For citation:

J.N. Muratkhodjaev, T.U. Aripova "RNA interference is the basis of human antiviral defense", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1065-1074.
doi: 10.15789/1563-0625-RII-2331
DOI: 10.15789/1563-0625-RII-2331

RNA INTERFERENCE IS THE BASIS OF HUMAN ANTIVIRAL DEFENSE

Muratkhodjaev J.N., Aripova T.U.

Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

Abstract. Comparative analysis of antiviral protective mechanisms in protozoa and RNA interference of multicellular organisms has revealed their similarity, also providing a clue to understanding the adaptive immunity. In this article, we present the latest evidence on the importance of RNA-guided gene regulation in human antiviral defense. The role of neutralizing antibodies and interferon system in viral invasion is considered. The new concept has been introduced, i.e., antiviral protection of any living organism is based on the intracellular RNA-guided mechanisms. Simple and effective defense against viruses is that spacer segment of the viral DNA is inserted into the cellular chromosomes. Upon re-infection, the RNA transcript of the spacer directs nuclease enzymes against the foreign genome. This is a really adaptive immune defense that any cell potentially possesses. In humans, the interferon system provides an additional tool for early suppression of viral infections which shifts the cells to the alert regimen, thus preventing further spread of infection. The main task of the human central immune system is to maintain integrity and combat foreign organisms. Accordingly, a suitable index of acquired antiviral immunity should be a presence of specific spacer markers in DNA samples from reconvalescent persons, rather than detection of neutralizing antibodies, B and T memory cells.

This article is addressed primarily to general medical community, and its practical conclusions are as follows:

1. Presence or absence of specific antibodies to SARS-CoV-2 is not a prognostic sign of the disease. Detection of specific antibodies in blood simply reflects the fact that the person has contacted with the viral agent. Absence of antibodies does not mean a lack of such contact, and the persons with high titers of specific antibodies are not protected from re-infection with SARS-CoV-2.

2. PCR testing: The PCR results may remain “false positive” in those subjects who have had COVID-19, if the genetic material is taken from the site of initial virus contraction (mainly, nasopharynx). In our opinion, negative PCR tests for COVID-19 in blood plasma and urine will be a more correct index for the absence of the disease, even with positive PCR tests from the nasopharyngeal samples.

3. It is necessary to draw attention of general practitioners to potential usage of retinol in prevention and treatment of COVID-19, given the importance of RLR receptors in recognition of viral RNAs and positive experience of vitamin A administration in measles, another dangerous viral disease.

Keywords: RNA-I, antiviral immunity, Interferon, COVID-19, SARS-CoV-2 spacers, antibody-dependant enhancement

Введение

Текущая пандемия COVID-19 стала настоящим испытанием для всех врачей и проверкой истинности наших знаний о работе иммунной системы. Повсеместный рост числа инфицированных людей, определяемый по показателям ПЦР и титров антител, заставляют не только вводить повторные карантинные меры, но и пересмотреть некоторые догмы иммунологии. Одна из таких догм состоит в том, что память о перенесенной инфекции формируется только Т- и В-клетками памяти. Множество работ, доказывающих наличие памяти у врожденного неспецифического иммунитета уже должны изменить наш взгляд (прекрасные обзоры по этой теме (Netea Mihai G. и соавт., 2011, Reimer-Michalski E.M., Conrath U., 2016) [30, 32]. С другой стороны масса научных данных, связанных с

РНК- управляемой регуляцией генов, позволяет по-новому оценить функционирование иммунной системы при вирусных инфекциях. Отталкиваясь от этих результатов, мы задались целью описать роль РНК-интерференции в противовирусной защите человека.

1. РНК-управляемая противовирусная защита

Для понимания механизма работы РНК-управляемой защиты, необходимо начать с одноклеточных, поскольку без выработки ими надежных механизмов борьбы с вирусами переход к многоклеточности был бы невозможен. Отметим, что для такого перехода понадобилось два миллиарда лет эволюции, в результате которой бактерии и археи смогли создать внутриклеточную защитную систему, которая хранит память о прошлых встречах с вирусами. Эта информация хранится в особых участках ДНК, которые появляются после встречи с чужеродным геномом ви-

руса или плазмиды и образуют массивы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). Вирус, проникший в клетку бактерии, обнаруживается белками Cas (CRISPR-associated), разновидностью нуклеаз, которые выполняют функцию ножниц и разрезают вирусные нуклеиновые последовательности. CRISPR-Cas — это настоящая адаптивная иммунная система с памятью о прошлых встречах с чужеродными вирусами, которая хранится в уникальных спейсерных последовательностях, полученных из вирусных и плазмидных геномов и вставленных в массивы CRISPR [2]. Транскрипты спейсеров вместе с частями окружающих повторов используются в качестве направляющих РНК для распознавания родственных последовательностей в чужеродных геномах и, таким образом, указывая нуклеазам Cas специфичные сайты расщепления [21].

Упрощая, можно сказать, что простая и эффективная защита от вирусов состоит в том, что часть ДНК вируса (спейсер) встраивается в геном клетки, и, при повторном заражении, копия этого спейсера в виде малой РНК направляет ферменты нуклеазы на уничтожение чужеродного генома (рис. 1).

В многоклеточных организмах имеется сходный механизм регуляции активности различных генов, называемый РНК-интерференцией. Мы полагаем, что он остается важнейшим компонентом адаптивной иммунной системы многоклеточных, в том числе человека. Впервые эта система была открыта в 1998 году у *Caenorhabditis elegans* Файером и соавт. [10], которые впоследствии были удостоены Нобелевской премии 2006 года по физиологии и медицине.

Механизм интерференции уже подробно изучен, ей широко пользуются в экспериментальной биологии для нокдауна определенных генов, и уже используют в клинике для лечения определенных онкологических заболеваний [1, 9, 14].

Сама интерференция заключается в остановке трансляции вирусных генов, путем их разрезания или модификации. Для этого в клетках имеется специальный комплекс ферментов-нуклеаз, который направляется малыми РНК, теми же транскриптами спейсеров. Конечным этапом «вакцинации» клетки-мишени после вирусной инвазии является встраивание спейсера в ДНК самой клетки. При повторном попадании этого вируса в клетку, синтезируемые при этом малые РНК загружаются в комплекс нуклеаз и направляют их на разрезание чужеродного генома (подробности — на рис. 1).

Таким образом, имеется полная аналогия между этими двумя системами РНК — управляемого

противовирусного иммунитета клеток. На современном этапе научных знаний, только вопрос деталей встраивания частей вирусного материала в ДНК клеток остается еще до конца не выясненным. Само существование таких механизмов уже описано в исследовании ретротранспозонов и псевдогенов [13, 39], где внутриклеточная обратная транскриптаза преобразует цитоплазматическую РНК и транскрипты ретроэлементов в комплементарные части ДНК. Человеческая теломераза, являющаяся по сути своей обратной транскриптазой, активно использует белки, участвующие в РНК-интерференции для синтеза теломера с последующей интеграцией их в ДНК хромосом. Надо отметить, что ретроэлементы составляют половину человеческой ДНК [23, 40], и закономерно предположить, что значительная часть генома человека является закодированными фрагментами ДНК ранее встречавшихся вирусных геномов — теми самыми спейсерами.

Уже доказана роль РНК интерференции при многих инфекциях, вызываемых респираторно-синцитиальным вирусом человека [4], вирусом иммунодефицита человека типа 1 [6], вирусом гепатита В [29] вирусом гепатита С [22, 43], вирусом гриппа [12] и коронавирусом SARS-CoV-1 [16]. Наличие таких спейсеров эффективно препятствует вирусной инфекции у млекопитающих. Было показано, что именно спейсеры в ДНК клеток-мишеней ингибируют размножение борнавирусов [11, 18].

Перечисленные выше данные, прямо указывают на способность самих клеток противостоять вирусной инвазии. Каждая клетка человеческого организма потенциально сохранила древнюю систему противодействия вирусам, основанную на использовании малых РНК. Причем, защита является адаптивной, т. е. подстраивается под конкретный вирус, и формирует полноценную внутриклеточную иммунную память!

2. Система раннего оповещения — интерфероновая противовирусная защита

Еще одним важным механизмом клеточной защиты является интерфероновая система, основанная на производстве специальных белков, препятствующих распространению вирусной инфекции [25, 41]. Мы полагаем, что эта дополнительная система понадобилась высокоорганизованным организмам для быстрого реагирования на вирусное вторжение. Само увеличение количества плотно сгруппированных однотипных клеток облегчает распространение вирусов — размножившись в одной чувствительной клетке, вирионы легко могут инфицировать и близлежащие. Соответственно, врожденная РНК-управляемая защита может и не справиться с высокой вирусной нагрузкой. Для предотвра-

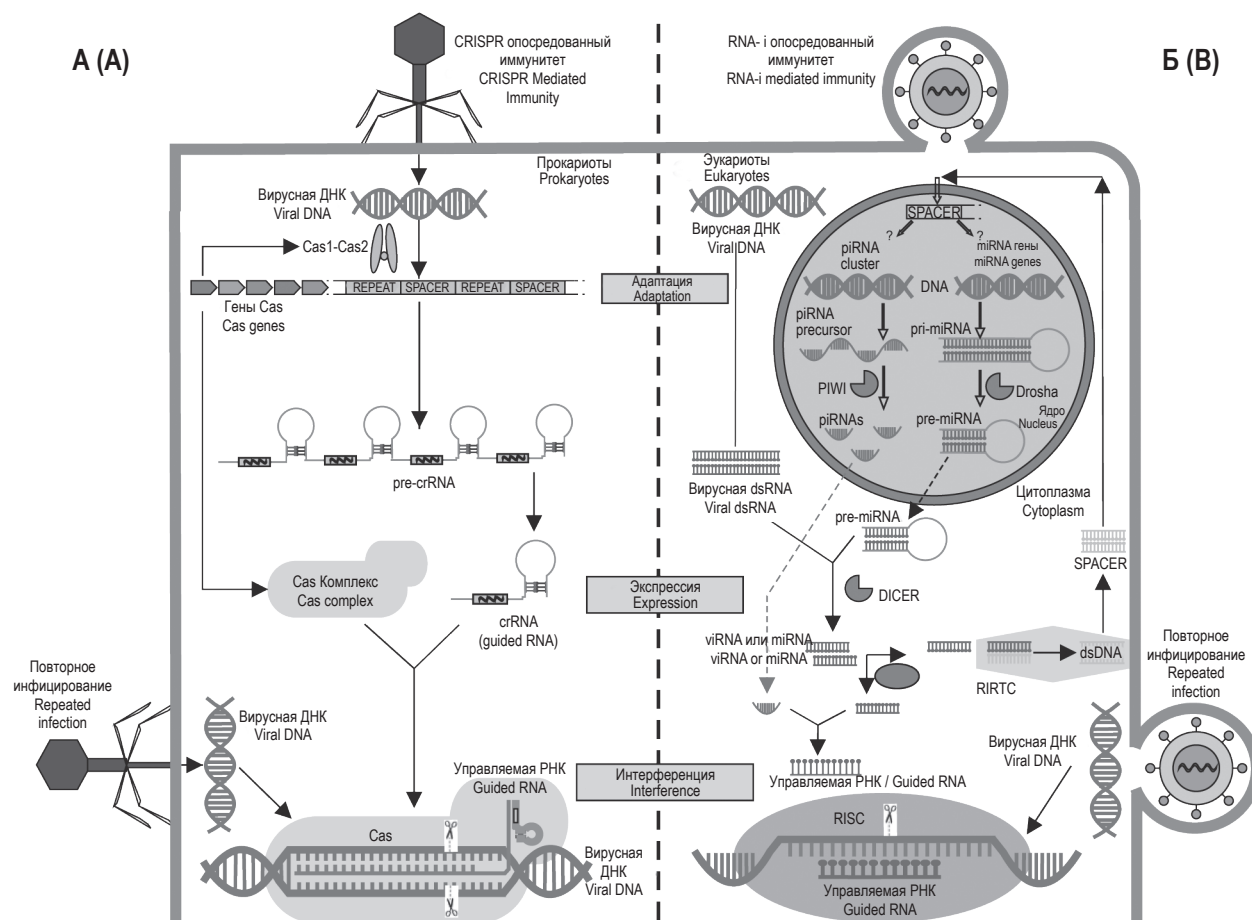


Рисунок 1. Ключевые этапы – адаптация, экспрессия и интерференция – противовирусных систем защиты простейших и человека

Примечание. А) Слева показана CRISPR-Cas иммунная система бактерий и архей. В процессе адаптации фаговая ДНК разрезается ферментами Cas1-Cas2 на спейсеры и интегрируется в специальный CRISPR-локус. Происходит формирование специфической адаптивной памяти о прошедшей инфекции. При повторном заражении РНК транскрипты этих спейсеров направляются в комплексы, образованный другими Cas-нуклеазами (здесь показан CRISPR-Cas9 комплекс), где служат матрицей для ферментов, по которой разрезают сходные нуклеотидные последовательности вирусного генома. Б) Этапы РНК-интерференции в клетках человека. При заражении клеток РНК- или ДНК-вирусами (полимеразы ДНК вирусов генерируют РНК последовательности) в цитоплазме образуются длинные двухцепочечные РНК, которые разрезаются нуклеазами DICER на короткие двухцепочечные viRNAs. После этого фермент AGO2 раскручивает цепочки viRNA и загружает их, соответственно, или в РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс (RISC), или в РНК-индуцируемый реверс транскрипционный комплекс (RRTC). В комплексе RISC осуществляется разрезание вирусных РНК, а в RRTC осуществляется синтез спейсера – двухцепочечной ДНК с РНК шаблона. Мы предполагаем, что здесь задействован комплекс обратной транскрипции, схожий с теломеразным TERT, в котором белок AGO2 направляет РНК-последовательность на формирование новых ДНК-теломер [37]. Спейсер интегрируется в ДНК-клетки, образуя специфическую память о прошедшей инфекции. (Остается неясным, где в хромосомах человека формируются спейсерные последовательности – в piRNA-кластерах или среди генов, отвечающих за образование miRNAs).

При повторном попадании вирусов в эту клетку, происходит транскрипция спейсера в pri-miRNA, которая под действием фермента DROSHA, укорачивается до pre-miRNA и уже в цитоплазме после разрезания DICER, загружается с помощью AGO2 в RISC и служит матрицей для разрезания вирусных РНК. РНК-и – РНК-интерференция; piRNA (Piwi-interacting RNA) кластер и miRNA (microRNA) гены – участки ДНК, кодирующие эти малые РНК; dsRNA – двухцепочечная РНК; dsDNA – двухцепочечная ДНК; viRNA – малые вирусные РНК; PIWI, DROSHA, DICER, AGO-2 – РНК-связывающие ферменты; RISC (RNA induced silencing complex) – РНК-направляемый комплекс выключения гена; RRTC (RNA induced reverse transcription complex) – РНК-направляемый комплекс обратной транскрипции; crRNA (guided RNA) – геновая РНК, распознающая и направляющая нуклеазы.

Figure 1. Key stages – adaptation, expression and interference of antiviral defense systems of protozoa and humans

Note. A) The left shows the immune system of bacteria and archaea CRISPR-Cas. During adaptation, phage DNA is cleaved by Cas1-Cas2 enzymes into spacers and integrated into a special CRISPR locus. There is a formation of a specific adaptive memory of the previous infection. Upon re-infection, RNA transcripts from these spacers are directed into complexes formed by other Cas nucleases (the CRISPR-Cas9 complex is shown here), where they serve as a template for enzymes that are used to cut similar nucleotide sequences in the viral genome.

B) Stages of RNA interference in human cells. When cells are infected with RNA or DNA viruses (DNA polymerases of viruses generate RNA sequences), long double-stranded RNAs are formed in the cytoplasm, which are cut by DICER nucleases into short double-stranded viRNAs. Thereafter, the AGO2 enzyme unwinds the viRNA strands and loads them, respectively, either into an RNA-induced silencing complex (RISC) or into an RNA-induced reverse transcriptional complex (RRTC). In the RISC complex, the viral RNAs are cleaved, and in the RRTC a spacer is synthesized – double-stranded DNA from the RNA template. We assume that this involves a reverse transcription complex similar to telomerase TERT, in which the AGO2 protein directs the RNA sequence to form new DNA telomeres [37]. The spacer integrates into the DNA of the cell, forming a specific memory of a past infection. (It remains unclear where exactly in human chromosomes spacer sequences are formed in piRNA clusters or at miRNA loci). When viruses enter this cell again, the spacer is transcribed into pri-miRNA, which, under the action of the DROSHA is shortened to pre-miRNA and already in the cytoplasm after DICER cutting, loaded by AGO2 into RISC and serves as a template for cleaving viral RNAs.

RNA-i – RNA interference; piRNA – Piwi-interacting RNA; miRNA – microRNA; dsRNA – double stranded RNA; dsDNA – double stranded DNA; viRNA – viral short RNA; PIWI, DROSHA, DICER, AGO-2 – RNA binding proteins; RISC (RNA induced silencing complex); RRTC – RNA induced reverse transcription complex; crRNA – crisp RNA.

ния такой возможности и была создана система раннего оповещения, использующая интерфероны как сигналы тревоги.

Все ядерные клетки имеют рецепторы к интерферону I. После связывания рецептора с интерфероном, происходит активация множества генов и клетка переходит в режим тревоги, при котором практически останавливается синтез белка, тормозится эндо- и экзоцитоз, что естественно препятствует как входу так и выходу вирусных частиц. Сам же интерферон вырабатывается клетками, в которые уже попали вирусы. Каждая клетка человека обладает большим арсеналом специальных рецепторов, распознающие определенные патогенные мотивы. В случае вирусной инвазии, имеются специальные цитоплазматические RLR рецепторы, распознающие вирусные двухцепочечные РНК. Их активация запускает целый каскад внутриклеточных механизмов, заканчивающихся синтезом интерферонов и провоспалительных цитокинов (рис. 2).

Сами интерфероны в свою очередь регулируют работу более 2000 ISG генов (Interferon Stimulated Gene), имеется отдельная база данных этих генов — «Интерфером» (<http://www.interferome.org/interferome/home.aspx>), освещающая их влияние на метаболизм клеток. В рамках нашего обзора хотелось бы только отметить несколько моментов. Во-первых, эпителиальные клетки, первыми встречающие различные патогены, дополнительно имеют и рецепторы к интерферону III, что подчеркивает необходимость быстрой и слаженной работы при вирусных инвазиях этих пограничных клеток организма. Во-вторых, при длительном контакте с интерфероном, клетка запускает процесс апоптоза, т.е. самоуничтожения. И третье — ряд ферментов, вырабатываемых под действием интерферона, блокируют нуклеазы, необходимые для полноценной работы РНК управляемой системы [37]. То есть добавочная страховочная интерфероновая система может не только мешать работе РНК управляемой защите но, и более того вызывать гибель клеток. Этот определенного рода антагонизм в работе интерфероновой и РНК управляемой систем противовирусной защиты рассматривается во многих научных статьях, обзор которых рассмотрен здесь [27]. Наше же видение следующее. Первая линия клеток, которые сталкиваются с проникновением вируса, представляет собой хорошо дифференцированные поверхностные эпителиальные или эндотелиальные клетки. При проникновении вируса внутрь этих клеток нуклеазы DICER сразу же начинают разрезать вирусный геном, TLR и RLR рецепторы в свою очередь запускают каскад синтеза интерферона. Эта первая неспецифичная фаза противодействия

вирусной инвазии. На этом этапе, все зависит от уровня вирусной нагрузки, если он небольшой, то инфицированные клетки справляются сами и, предупредив соседние интактные клетки об инфекции, помогают последним уменьшить восприимчивость к вирусам. Инфекция прерывается без выраженной клинической картины. При большей нагрузке, инфицированные клетки уходят в апоптоз, а соседние под действием возрастающих доз интерферона останавливают синтез белка, экзо- и эндоцитоз, останавливается работа практически всех ферментов, клетки как бы замирают. Под действием интерферонов и других цитокинов активируется центральная иммунная система, появляются первые антитела и симптомы воспаления. Инфицированные клетки, несущие на своей поверхности вирусные антигены, привлекают Т-киллеров, происходит опсонизация этих клеток антителами, активируется система комплимента. Происходит манифестация всех признаков инфекции. Отметим, пока на плазматической мембране клеток будут находиться вирусные белки иммунная система находится в активированном состоянии. И более того, все эти клетки подлежат уничтожению.

В то же самое время в базальных слоях этих тканей, где находятся активно пролиферирующие и унипотентные клетки, при попадании самих вирусов и/или спейсеров от зараженных выше клеток, начинает формироваться адаптивная внутриклеточная противовирусная защита. Ранее было показано, что низкодифференцированные клетки, под действием интерферона не останавливают РНК и белковый синтез [8]. Соответственно, здесь остается место для полноценной работы РНК интерференции, не нарушаемой блокирующими сигналами интерферона. Соответственно, иммунная память формируется в унипотентных клетках-предшественниках, когда в них проникает вирус или спейсерные РНК через внеклеточные везикулы (более подробно о роли везикул в разделе дискуссия) [17]. После созревания эти клетки уже будут обладать специфической антивирусной памятью, что дает им мощный инструмент для эффективного устранения новых инвазий вирусов.

Вновь образованный слой клеток, легко справляется с остаточной вирусной нагрузкой и уже не несет антигенов вируса, центральная иммунная система не получая стимуляции, возвращается в обычный режим. Такая смена эндотелиальных и эпителиальных клеток обычно занимает несколько дней, что и составляет время, необходимое для формирования специфической локальной противовирусной памяти.

Таким образом, мы полагаем, что истинной противовирусной защитой потенциально обла-

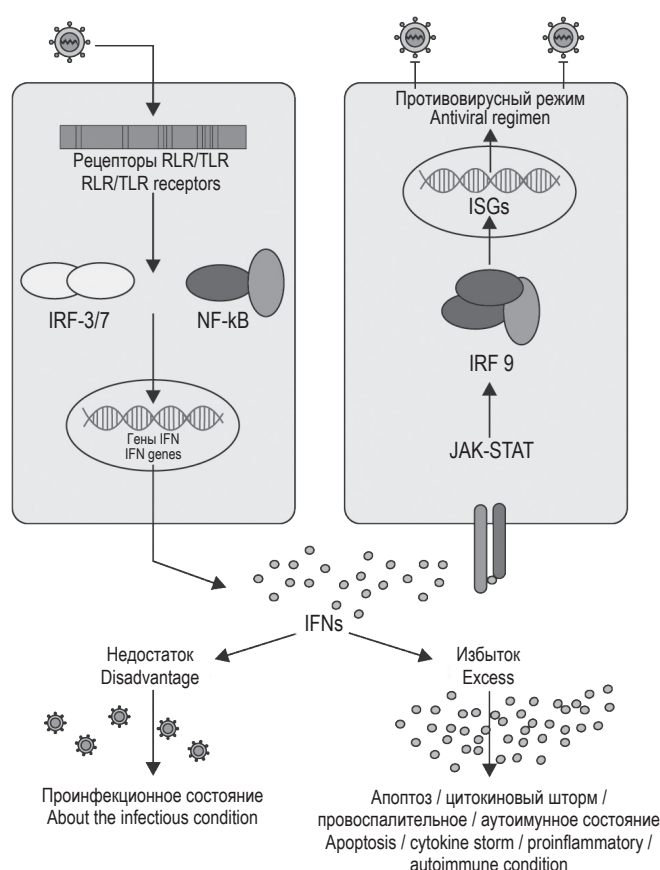


Рисунок 2. Интерфероновая система оповещения (адаптировано по [31])

Примечание. Активация внутриклеточных рецепторов RIG-1 и MDA5 вирусными dsRNA, а также TLR 7/8 ssRNA приводит к фосфорилированию интерферон регуляторных факторов 3/7 (IRF3/7) и провоспалительных факторов NF-κB. Эти транскрипционные факторы вызывают экспрессию интерфероновых генов и провоспалительных цитокинов после перемещения внутрь ядра.

Вновь синтезированные интерфероны связываются с своими рецепторами на соседних клетках и индуцирует экспрессию IFN-стимулированных генов (ISGs) через сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции (STAT), активируемой Янусом (Jak). Под действием продуктов этих генов – рестрикционных факторов, клетка переходит в режим тревоги, приостанавливая синтез белка, в том числе вирусных, и помечая все вновь синтезированные белки для последующей их деградации при дополнительном подтверждении. Замедляется везикулярный транспорт, что приводит к препятствованию сборки и выходу из клетки вирионов.

Избыток выработки интерферонов вызывает апоптоз клеток и генерализованный цитокиновый шторм. Возникает риск аутоиммунных заболеваний. Недостаток выработки интерферонов не подготавливает клетки к вирусной инвазии, соответственно ухудшает течение инфекционного заболевания.

IFNs – интерфероны; RIG-1 (retinoic acid inducible gene-1), MDA5 (Melanoma Differentiation Associated protein-5) входят в группу RLR (RIG-I-like receptors) рецепторов; TLR 7/8 – (Toll-like receptors) – эндосомальные рецепторы одноцепочечной РНК; IRF (interferon regulatory factor); NF-κB (nuclear factor kappa B) – транскрипционные факторы; JAK-STAT, Janus Kinases – преобразователь сигналов и активатор транскрипционных белков; ISGs – гены, стимулируемые интерфероном.

Figure 2. Interferon alarm system (adopt from Onomoto et al. [31])

Note. Activation of cytoplasm receptors RIG-1 and MDA5 by viral dsRNAs, as well as endosomal receptors TLR 7/8 by ssRNAs, lead to phosphorylation of interferon regulatory factors 3/7 (IRF3/7) and pro-inflammatory factors NF-κB. These transcription factors induce the expression of interferon genes and inflammatory cytokines upon the nuclear translocation. Newly synthesized interferons bind to their receptors on neighboring cells and induce the expression of IFN-stimulated genes (ISGs) through signal transducers and transcriptional activators (STAT) activated by Janus (Jak). Under the influence of the products of these genes - restriction factors - the cell goes into alarm mode, stops the proteins synthesis, including viral ones, and marks all newly synthesized proteins for their subsequent degradation with additional confirmation. Vesicular transport slows down, which leads to inhibition of virion assembly and release. Excessive production of IFN induces cell apoptosis and is associated with the development of a cytokine storm.

In this condition, there is a risk of autoimmune diseases. The lack of interferon production does not prepare cells for viral invasion and, as a result, exacerbates an infectious disease.

IFNs – Interferons; IFN genes – Interferon Genes; RIG-1 – Retinoic acid inducible gene-1; MDA5 – Melanoma Differentiation Associated protein-5; TLR 7/8 – Toll-like receptors; IRF – interferon regulatory factor; NF-κB – nuclear factor kappa B; JAK (Janus Kinases) – STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins); ISGs – Interferon Stimulated Genes.

дает каждая клетка организма. И именно работа РНК интерференции определяет течение вирусного заболевания.

Обсуждение

Система CRISPR-Cas оказалась настолько эффективной в борьбе с мобильными генетическими элементами, что сохранила свою роль и у многоклеточных организмов слегка изменившись, с учетом наличия ядерной мембраны и концевых хромосом. Основной целью, вновь созданной высшими животными центральной иммунной системы, основанной на Т- и В-клетках, является поддержание целостности и борьба с чужеродными организмами. Для выполнения этой цели иммунная система обладает фагоцитирующими, регуляторными, антигенпредставляющими и киллерными клетками, а также системой комплемента и, конечно, разнообразными антителами. Система комплемента представляет собой группу белков, при активации которых, образуются мембранолитические каскады, разрушающие клетки-мишени. Классическим путем активации комплемента является присоединение к Fc-фрагменту антител (это неизменная часть всех антител организма). Хотелось бы подчеркнуть, антитела не являются защитным средством, даже в высоких концентрациях, они выполняют лишь диагностическую и направляющую роль. В многотриллионном человеческом организме антитела помогают иммунным клеткам найти «чужих», связываясь со специфическими чужеродными антигенами (опсонизация). Именно, Fc-фрагмент антител является «черной меткой» для иммунных клеток и комплемента, которые воспринимают ее как сигнал к уничтожению этого объекта. В случае с бактериями, простейшими, грибами и гельминтами это рабочая стратегия, помеченные антителами они уничтожаются. Это срабатывает и для борьбы с мутантными, в том числе опухолевыми клетками, где антитела связываются с раковыми антигенами и такие клетки также выбраковываются. Но, что происходит в случае вирусной инфекции. Априори, вирусы размножаются только внутри клеток, и при связывании вирусных антигенов на плазматической мембране антителами, они также уничтожаются. Для целого организма это благо — нашли чужого, пусть даже внутри своих клеток, и уничтожили, пожертвовали частным ради целого. Отметим, другой судьбы у этих зараженных клеток нет — они все уничтожаются.

Пока вирусы не проникли внутрь клеток, они представляют собой лишь набор нуклеиновых кислот и белков, не размножаются и не оказывают никакого патологического влияния на организм. При связывании вирусов антитела-

ми, они конечно теряют способность поражать клетки-мишени, затрудняя их связь с клеточными рецепторами. Именно этим обосновывается стратегия вакцинаций. Но рассмотрим дальнейший ход событий. Образовавшийся комплекс вирус-антитело должен быть уничтожен путем фагоцитоза иммунными клетками, несущими рецептор к Fc-фрагменту. Во многих случаях это так и происходит, но если фагоцитоз оказывается не эффективным, и вирус остался жизнеспособным внутри этих клеток, то инфекция лишь усиливается, так как вирус заразил клетки, не несущие к нему рецепторы, и этот феномен называется антитело-зависимым усилением инфекции (antibody-dependent enhancement — ADE) [15, 33, 36]. В ADE вирус не только заражает восприимчивые клетки через соответствующий рецептор, но и проникает внутрь моноцитов/макрофагов, гранулоцитов, тромбоцитов, тучных клеток и многих других клеток-хозяев посредством взаимодействия с рецепторами к Fc-фрагменту или комплементу [20]. Существует множество примеров ADE, вызванных альфа- и бета-коронавирусами [38, 42]. Текущие клинические данные о протекании COVID-19 явно указывают на вовлечение антител в усиление клинических проявлений болезни. У наиболее тяжелых больных отмечалось наивысшие титры антител [5]. Характерная черта COVID-19 — коагулопатия явно указывает на гиперактивность комплемента [26]. И этот процесс уничтожения собственных клеток не останавливается до тех пор, пока они несут на своей поверхности вирусные антигены. Лишь в результате работы РНК-направляемых нуклеаз, клетка очищается от вирусного генома и, соответственно, от вирусных белков. Активация центральной иммунной системы прекращается, титры антител падают, наступает выздоровление.

Описывая противовирусный иммунитет человека нельзя не остановиться на механизмах защиты в раннем младенческом возрасте. Как показали последние данные в состав грудного молока наряду с антителами входят до 1400 различных типов микроРНК [3]. Учитывая способность каждой из этих молекул изменять активность в среднем 15–20 генов, появляется огромная возможность для подавления или усиления активности генов грудных детей. Подавляющее количество этих микроРНК находятся в составе внеклеточных везикул. Было показано, что эти микроРНК после всасывания регистрируются в кровотоке и во всех тканях организма, включая головной мозг [28, 44]. Так что, говоря о противовирусном иммунитете необходимо подчеркнуть наличие такой передачи защиты через молоко ребенку.

Таким образом, классический адаптивный Т- и В-клеточный иммунитет, на показатели ко-

торого в основном ориентируются при прогнозе инфекционного заболевания, именно при вирусных инвазиях не является основным компонентом борьбы. И по нашему мнению, чем меньше он вовлечен в развитие вирусной инвазии, тем легче протекает заболевание и лучше прогноз. Возвращаясь, к роли РНК-управляемого клеточного иммунитета, надо подчеркнуть, именно этот механизм дает полноценную адаптивную защиту от вирусов.

Выводы

РНК управляемое регулирование активности генов, как своих, так и чужеродных является основным механизмом борьбы с вирусами на протяжении всей эволюции живого на Земле.

Интерфероновая система, направленная на предупреждение об опасности, дополняет ее, а «классическая» иммунная система, основанная на Т- и В-клетках направлена на поддержание целостности и борьбу с чужеродными организмами. Настоящим обретенным противовирусным иммунитетом будут не наличие В- и Т-клеток памяти, не нейтрализующие антитела, а наличие специфических спейсеров в ДНК переболевших людей.

Данная статья, описывающая работу этих защитных механизмов, предназначена в первую очередь для широкой медицинской обществен-

ности, и практические выводы для врачей следующие:

1. Наличие или отсутствие специфических антител к SARS-CoV-2 АТ не является прогностическим признаком болезни. Наличие в крови антител лишь отражает факт контакта этого человека с вирусом. Отсутствие антител не говорит об отсутствии контакта. Имеющие высокий титр специфических антител люди не защищены от повторной инфекции SARS-CoV-2, а скорее всего перенесут инфекцию тяжелее из-за АДЕ.

2. ПЦР-тесты. У переболевших COVID-19 ПЦР тест может быть ложно положительными при условии забора материала из мест проникновения вируса. На наш взгляд, правильным показателем отсутствия болезни будут отрицательные тесты ПЦР на COVID-19 плазмы крови и мочи, даже при положительном результате при заборе из носоглотки.

3. Надо привлечь внимание врачей к возможному использованию витамина А в профилактике и лечении COVID-19, учитывая важность RLR рецепторов в распознавании вирусных РНК. Учитывая положительный опыт применения витамина А при другом опасном вирусном заболевании – кори. При этой инфекции было показано, что дефицит витамина А четко коррелировал с тяжестью течения, а своевременное лечение кори с помощью двух доз ретинола (200 000 МЕ) резко снижало заболеваемость и смертность [7, 19, 34].

Список литературы / References

1. Abdelrahim M., Safe S., Baker C., Abudayyeh A. RNAi and cancer: Implications and applications. *J RNAi Gene Silencing*, 2006, Vol. 2, no. 1, pp.136-145.
2. Barrangou R. The Roles of CRISPR-Cas Systems in Adaptive Immunity and Beyond. *Curr. Opin. Immunol.*, 2015, Vol. 32, pp. 36-41.
3. Benmoussa A., Provost P. Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2019, Vol. 18, no. 3, pp. 703-722.
4. Bitko V., Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.*, 2001, Vol. 1, 34. doi: 10.1186/1471-2180-1-34.
5. Chen X., Pan Z., Yue S., Yu F., Zhang J., Yang Y., Li R., Liu B., Yang X., Gao L., Li Z., Lin Y., Huang Q., Xu L., Tang J., Hu L., Zhao J., Liu P., Zhang G., Chen Y., Deng K., Ye L. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020, Vol. 5, no. 1, 180. doi: 10.1038/s41392-020-00301-9.
6. Coburn G.A., Cullen B.R. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA Interference. *J. Virol.*, 2002, Vol. 76, no. 18, pp. 9225-9231.
7. D'Souza R.M., D'Souza R. Vitamin A for the treatment of children with measles—a systematic review. *J. Trop. Pediatr.*, 2002, 48, pp. 323-327.
8. Eggenberger J., Blanco-Melo D., Panis M., Brennand K.J., ten Oever B.R. Type I interferon response impairs differentiation potential of pluripotent stem cells. *PNAS*, 2019, Vol. 116, no. 4, pp. 1384-1393.
9. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, Vol. 411, no. 6836, pp. 494-498.
10. Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, Vol. 391, 6669, pp. 806-811.

11. Fujino K., Masayuki H., Tomoyuki H., Merriman D.K., Keizo T. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *PNAS*, 2014, Vol. 111, no. 36, pp. 13175-1318. doi: 10.1073/pnas.1407046111.
12. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.-H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 5, pp. 2718-2723.
13. Habibi, L., Salmani, H. Pivotal impacts of retrotransposon based invasive RNAs on evolution. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 1957. doi:10.3389/fmicb.2017.01957.
14. Han H. RNA Interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* 2018, 1706, pp. 293-302.
15. Hawkes RA. Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1964, Vol. 42, pp. 465-482.
16. He M.L., Zheng B., Peng Y., Peiris J.S., Poon L.L., Yuen K.Y., Lin M.C., Kung H.F., Guan Y. Inhibition of SARS-associated coronavirus infection and replication by RNA interference. *JAMA*, 2003, Vol. 290, no. 20, pp. 2665-2666.
17. Holtzman J., Lee H. Emerging role of extracellular vesicles in the respiratory system. *Exp. Mol. Med.*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 887-895.
18. Honda T., Keizo T. Endogenous Non-Retroviral RNA Virus Elements Evidence a Novel Type of Antiviral Immunity. *Comment Mob. Genet. Elements*, 2016, Vol. 6, no. 3, e1165785. doi:10.1080/2159256X.2016.1165785.
19. Huiming Y., Chaomin W., Meng M. Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2005, Vol. 4, CD001479. doi: 10.1002/14651858.CD001479.pub3.
20. Khandia R., Munjal A., Dhama K., Karthik K., Tiwari R., Malik Y.S., Singh R.K., Chaicumpa W. Modulation of Dengue/Zika virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika virus infection. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 597. doi:10.3389/fimmu.2018.00597.
21. Koonin E., Makarova K.S. Mobile Genetic Elements and Evolution of CRISPR-Cas Systems: All the Way There and Back. *Genome Biol. Evol.*, 2017, Vol. 9, no. 10, pp. 2812-2825.
22. Krönke J., Ralf K., Buchholz F., Windisch M.P., Pietschmann T., Bartenschlager R., Frese M. Alternative Approaches for Efficient Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by Small Interfering RNAs. *J. Virol.*, 2004, Vol. 78, no. 7, pp. 3436-3446.
23. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann Y., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissole S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglu S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y.J., Szustakowski J., International Human Genome Sequencing Consortium. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, vol. 409, no. 6822, pp. 860-921.
24. Laudadio I., Orso F., Azzalin G., Calabrò C., Berardinelli F., Coluzzi E., Gioiosa S., Taverna D., Sgura A., Carissimi C., Fulci V. AGO2 promotes telomerase activity and interaction between the telomerase components TERT and TERC. *EMBO Rep.*, 2019, Vol. 20, no. 2, e45969. doi: 10.15252/embr.201845969.

25. Levy D.E. Whence Interferon? Variety in the Production of Interferon in Response to Viral Infection. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 4, pp. 15-18.
26. Lo M.W., Kemper C., Woodruff T.M. COVID-19: Complement, Coagulation, and Collateral Damage. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 205, no. 6, pp. 1488-1495.
27. Maillard P.V., van der Veen A.G., Poirier E.Z., Reis e Sousa C. Slicing and dicing viruses: antiviral RNA interference in mammals. *EMBO J.*, 2019, Vol. 38, no. 8, e100941. doi: 10.15252/embj.2018100941.
28. Manca S., Upadhyaya B., Mutai E., Desaulniers A.T., Cederberg R.A., White B.R., Zemleni J. Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 11321. doi: 10.1038/s41598-018-29780-1.
29. McCaffrey A.P., Nakai H., Pandey K., Huang Z., Salazar F.H., Xu H., Wieland S.F., Marion P.L., Kay M.A. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 2003, Vol. 21, no. 6, pp. 639-644.
30. Netea M.G., Quintin J., van der Meer J.W.M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe*, 2011, Vol. 9, no. 5, pp. 355-361.
31. Onomoto K., Onoguchi K., Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 539-555.
32. Reimer-Michalski E.M., Conrath U. Innate immune memory in plants. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 4, pp. 319-327.
33. Smatti M.K., Asmaa A., Thani A., Yassine H.M. Viral-induced enhanced disease illness. *Front. Microbiol.* 2018, Vol. 9, 2991. doi: 10.3389/fmicb.2018.02991.
34. Soye K.J., Trottier C., Richardson C.D., Ward B.J., Miller W.H. Jr. RIG-I is required for the inhibition of measles virus by retinoids. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 7, e22323. doi: 10.1371/journal.pone.0022323.
35. Stetson D.B., Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006, Vol. 25, no. 3, pp. 373-381.
36. Tirado S.M., Yoon K.J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.*, 2003, Vol. 16, no. 1, pp. 69-86.
37. van der Veen A.G., Maillard P.V., Schmidt J.M., Lee S.A., Deddouche-Grass S., Borg A., Kjær S., Snijders A.P., Reis e Sousa C. The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells. *EMBO J.*, 2018, Vol. 37, no. 4, e97479. doi:10.15252/embj.201797479.
38. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z., Zhou Y., Du L., Li F. Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry. *J. Virol.*, 2020, Vol. 94, no. 5, pp. 2015-2019.
39. Wei W., Morrish T.A., Alisch R.S., Moran J.V. A transient assay reveals that cultured human cells can accommodate multiple LINE-1 retrotransposition events. *Anal. Biochem.*, 2000, Vol. 284, no. 2, pp. 435-438.
40. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capi P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 973-982.
41. Wu J., Chen Z.J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 461-488.
42. Yip M.S., Cheung C.Y., Li P.H., Bruzzone R., Malik P.J.S., Martial J. Investigation of Antibody-Dependent Enhancement (ADE) of SARS coronavirus infection and its role in pathogenesis of SARS. *BMC Proc.*, 2011, Vol. 5, P80. doi: 10.1186/1753-6561-5-s1-p80.
43. Yokota T., Sakamoto N., Enomoto N., Tanabe Y., Miyagishi M., Maekawa S., Yi L., Kurosaki M., Taira K., Watanabe M., Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 2003, Vol. 4, no. 6, pp. 602-608.
44. Zemleni J. Milk exosomes: beyond dietary microRNAs. *Genes Nutr.*, 2017, Vol. 12, 12. doi: 10.1186/s12263-017-0562-6.

Авторы:

Муратходжаев Д.Н. — к.б.н., заведующий отделом международных связей Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан
Арипова Т.У. — д.м.н. профессор, академик Академии наук Республики Узбекистан, директор Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан

Authors:

Muratkhodjaev J.N., PhD (Biology), Head, Scientific Relations Department, Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan
Aripova T.U., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Director, Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

Поступила 05.04.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 05.04.2021
Accepted 04.01.2022