

УДК 575:578.23

ГЕНЕТИКА, ГЕНОМИКА И МЕТАГЕНОМИКА COVID-19

**Г.В. ГЛАЗКО¹, Г.Ю. КОСОВСКИЙ²,
Б.Л. ЗЫБАЙЛОВ³, В.И. ГЛАЗКО^{2,4},
Т.Т. ГЛАЗКО^{2,4}**

¹ ДЕПАРТАМЕНТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ
ИНФОРМАТИКИ УНИВЕРСИТЕТА
МЕДИЦИНСКИХ НАУК АРКАНЗАСА, США
² ФГБНУ НИИ ПУШНОГО ЗВЕРОВОДСТВА
И КРОЛИКОВОДСТВА ИМЕНИ
В.А. АФАНАСЬЕВА

³ ОТДЕЛЕНИЕ БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ
БИОЛОГИИ, АРКАНЗАССКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МЕДИЦИНСКИХ НАУК, США

⁴ ФГБОУ ВПО РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ—
МСХА им. К.А. ТИМИРЯЗЕВА

Представлен обзор ряда работ, в которых рассматриваются основные гены, метаболические пути и физиологические системы, участвующие в ответе на инфицирование человека вирусом SARS-CoV-2. Рассматривается наличие фуринового сайта для протеолиза в рецепторном мотиве вирусного S белка, наличие которого, как предполагается, обеспечивает CoV-2 относительно (по сравнению с CoV) повышенную контагиозность и вовлечение ряда других протеаз (таких, как нейропилин-1), способствующих проникновению вируса в клетки хозяина. Выделяются основные динамические узлы, изменчивость состояния которых может оказывать ключевое влияние на развитие заболевания, к ним относятся ось ACE2/анготензин-(1–7)/MAS, фактор фон Виллибранда, трансформирующий фактор роста (TGF-β) и некоторые другие. Приводятся исследования по множественности метаболических путей, в которых участвует TGF-β, начиная от вовлеченности в формирование фиброзов в легких до подавления адаптивного иммунитета при широком спектре вирусных инфекций. Представлены данные о созданной карте интерактома между 26 белками вируса и 332 белками инфицированного CoV2 хозяина. Рассматриваются собственные результаты оценок межбелковых взаимодействий между белком хозяина ACE2 – основного рецептора вируса, и последовательными группами белков первого круга, который взаимодействует с ACE2, затем белков второго круга, которые взаимодействуют с белками первого, и затем – белков третьего круга, которые вступают во взаимодействия с белками второго круга. Сложная иерархическая структура выявленных межбелковых взаимодействий, их множественность, зависимость от таких системных регуляторов как половые гормоны, исходное состояние пациента до контакта с патогеном, свидетельствует о недостаточной надежности

GENETICS, GENOMICS AND METAGENOMICS OF COVID-19

**G.V. GLAZKO¹, G.YU. KOSOVSKY²,
B.L. ZYBAILOV³, V.I. GLAZKO^{2,4},
T.T. GLAZKO^{2,4}**

¹ DEPARTMENT OF BIOMEDICAL INFORMATICS, UNIVERSITY OF ARKANSAS FOR MEDICAL SCIENCES, USA

² AFANAS'EV RESEARCH INSTITUTE OF FUR-BEARING ANIMAL BREEDING AND RABBIT BREEDING, RODNIKI, RAMENSKIY REGION, MOSCOW PROVINCE, RUSSIA

³ DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, UNIVERSITY OF ARKANSAS FOR MEDICAL SCIENCES, USA

⁴ TIMIRYAZEV RUSSIAN STATE AGRARIAN UNIVERSITY—MOSCOW AGRARIAN ACADEMY, RUSSIA

A review of a number of papers that examine the main genes, metabolic pathways, and physiological systems involved in the response to human infection with the SARS-CoV-2 virus is presented. The furin cleavage site in receptor motif of the viral S protein, which, as expected, provides a CoV-2 relatively (compared to CoV) increased contagiousness and the involvement of other proteases (such as neuropilin-1), promotes the penetration of the virus into the host cells, is discussed. The main dynamic nodes are identified, the variability of which can have a key influence on the development of the disease, these include the ace2/angiotensin-(1–7)/MAS axis, von Willibrand factor, transforming growth factor (TGF-β), and some others. There are studies on the multiplicity of metabolic pathways in which TGF-β is involved, ranging from involvement in the formation of fibrosis in the lungs to the suppression of adaptive immunity as so in a wide range of viral infections. Data on the created interactome map between 26 virus proteins and 332 proteins of the infected CoV2 host are presented. We consider our own results of evaluating inter-protein interactions between the host protein ACE2 – the main receptor of the virus, and successive groups of first-round proteins that interact with ACE2, then second-round proteins that interact with first – round proteins, and then third-round proteins that interact with second-round proteins. The complex hierarchical structure of the identified inter-protein interactions, their multiplicity, dependence on such systemic regulators as sex hormones, the initial state of the patient before contact with the pathogen, indicates that the control of individual gene products is not reliable enough

контроля продуктов отдельных генов для контроля и предупреждения неблагоприятного развития инфекционного процесса. Геномные сопоставления не дают возможности прийти к надежному заключению о том, повышенная мутабильность отдельных участков является нейтральной по отношению к патогенности вируса либо обусловлена «позитивной» селекцией, поддерживающей изменчивость в определенных функциональных районах. Определенную надежду вызывают результаты исследований микробиоты инфицированных CoV2 пациентов и положительные результаты их бактериальной терапии.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, ось ACE2/ангеотензин-(1-7)/MAS, белок-белковый интерактом, синдром DIC, T и B лимфоциты, бактериальная терапия.

КОРОНАВИРУС SARS-COV-2 И ЕГО ГЕНОМ

Коронавирусная пандемия 2019 (COVID-19) – разновидность вирусной пневмонии, которая обозначается как тяжелый острый респираторный синдром, индуцируемый коронавирусом 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 - SARS-CoV-2). Появление SARS-CoV-2 рассматривается как третье внедрение высокопатогенного коронавируса в популяции человека после коронавируса, индуцирующего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV) и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) в XXI веке [19].

Коронавирусы классифицируются как принадлежащие отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae* и подсемейству *Orthocoronavirinae* (рис. 1). Геном этого подсемейства один из самых больших среди РНК вирусов, от 26 до 32 тысяч нуклеотидов. На основании различных критериев, оно подразделяется на четыре рода – альфа коронавирус (α -CoV), бета коронавирус (β -CoV), гамма коронавирус (γ -CoV) и дельта коронавирус (δ -CoV) [36]. Секвенирование генома SARS-CoV-2 позволило выявить 79% гомологию по отношению к геному SARS-CoV и 50% по сравнению с геномом MERS-CoV [20]. На основании сравнения полученных результатов секвенирования, выполненный филогенетический анализ позволил разместить SARS-CoV-2 в подрод Sarbecovirus рода β -CoV (рис. 1).

Патология легких при тяжелом течении заболевания отличается от ранних стадий прогрессирующей потерей целостности эпителия-эндотелия, повреждением капилляров и выраженным локализованным внутрисосудистым свертыванием крови. Если более ранний этап развития пневмонии отражает прямую инфекцию пневмоцитов II типа, то процессы, которые лежат в основе следующей, потенциально смертельно опасной фазы острого повреждения легких с сопутствующим разрушением респираторного эпителиального барьера, повреждением эндотелия и ухудшением

to control and prevent the adverse development of the infectious process. Genomic comparisons do not allow us to come to a reliable conclusion that the increased mutability of individual sites is neutral in relation to the pathogenicity of the virus or is due to «positive» selection that supports variability in certain functional areas. There is some hope for the results of research on the microbiota of CoV2-infected patients and the positive results of their bacterial therapy.

KEYWORDS: SARS-CoV-2, ACE2/angeotensin-(1-7)/MAS axis, protein-protein interactome, DIC syndrome, T and B lymphocytes, bacterial therapy.

состояния пациента (рис. 2), остается недостаточно исследованным [23].

Основная структура геномов этой группы видов подрода Sarbecovirus изучена и схематично представлена на рис. 3, так же как и результат сравнения геномов SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV на рис. 2 [19]. Эти геномы содержат, по меньшей мере, десять открытых рамок считывания (ORFs) (рис. 2).

Первые ORF1a/b занимают около двух третей вирусной РНК и транслируются в два больших полипротеина, в случаях SARS-CoV и MERS-CoV формируются два полипротеина, pp1a и pp1ab, содержат 16 неструктурных белков (nsp1-nsp16), которые участвуют в формировании репликазно – транскриптазного комплекса. Эти неструктурные последовательности перестраивают мембранны шероховатого эндоплазматического ретикулума в двухмембранные везикулы, в которых происходят репликация и транскрипция вируса. Другие ORFs SARS-CoV-2 на одной трети генома кодируют четыре основных структурных белка: спайковый (S), покровный (E), нуклеокапсидный (N) и мембранный (M), а также несколько вспомогательных белков с неизвестными функциями, которые не участвуют в репликации вируса (рис. 4).

S белок использует N-концевую сигнальную последовательность для получения доступа в эндоплазматический ретикулум, его структура зависит, в частности, от гликозилирования. S-гликопротеин SARS-CoV-2 содержит 22 N-гликановых позиций в каждом из трех протомеров. Таким образом, на поверхности тримерного S-гликопротеина имеется 66 сайтов гликозилирования. S-гликопротеин опосредует прямое и косвенное взаимодействие вируса с клетками хозяина [17]. Все коронавирусы имеют поверхностный S-гликопротеин, который несет рецептор-связывающий домен (RBD). S-гликопротеин имеет четко выраженную структуру шипа. Когда гликопротеин связывается с рецептором клетки хозяина, фермент фурин (сериновая протеаза хозяина, опознавающая аминокислотную последовательность Arg-Arg-Ala-Arg для раз-

резания), расщепляет S гликопротеин, что позволяет вирусу проникать в клетки хозяина. Продуктами расщепления являются S1 и S2 белки, которые существуют в виде комплекса S1/S2, где S1 в гомотримерной форме взаимодействует с мембраной клетки-хозяина, а S2 проникает в цитоплазму клетки. В S1 локализован большой рецептор-связывающий домен белка S, а S2 образует стебель шипа (рис. 5).

Обнаружено, что мононуклеотидная замена в S1 домене приводит к существенному увеличению инфекционности коронавируса, что свидетельствует о ключевом значении этого домена для распространения COVID-19 [39, 7, 18].

M-белок с тремя трансмембранными доменами определяет форму вирусной оболочки - имеет небольшой N-концевой гликозилированный эктодомен и гораздо больший C-концевой эндодомен.

N-белок распознает вирусный РНК-геном. N-белок связывается с вирусной РНК и комплексом репликаза-транскриптаза. NSP3 (6VXS – домен аденоzin дифосфат рибоза фосфатазы) CoV блокирует врожденные иммунные реакции хозяев. После входа в клетки хозяина, для транскрипции CoV и высвобождения частиц, РНК-шапероны, такие как неспецифические белки, связывающие нуклеиновые кислоты, индуцируют конформационные сдвиги ssRNA. N – нуклеокапсидный белок известен как РНК-шаперон. Например, гликогенсинтаза киназа 3 (GSK3) фосфорилирует N-белок SARS-CoV, и таким образом ингибирование GSK3 способствует снижению репликативной активности SARS-CoV. Кроме того, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1) регулирует сплайсинг мРНК в ядре и непрерывную трансляцию hnRNPA.

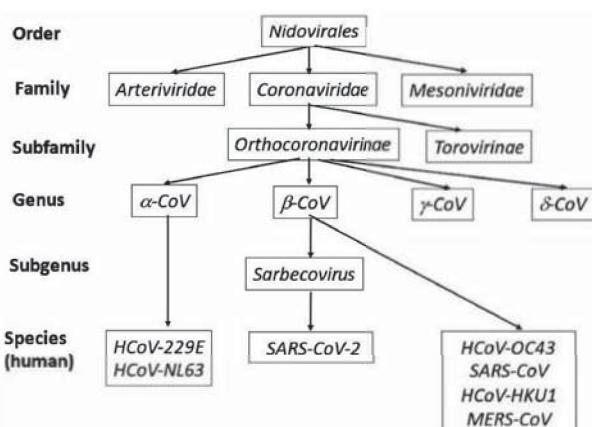


РИС. 1.

Классификация коронавирусов человека [№21 – Malik Y. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian J Pathol* 2020; 42(1) : 3–11]

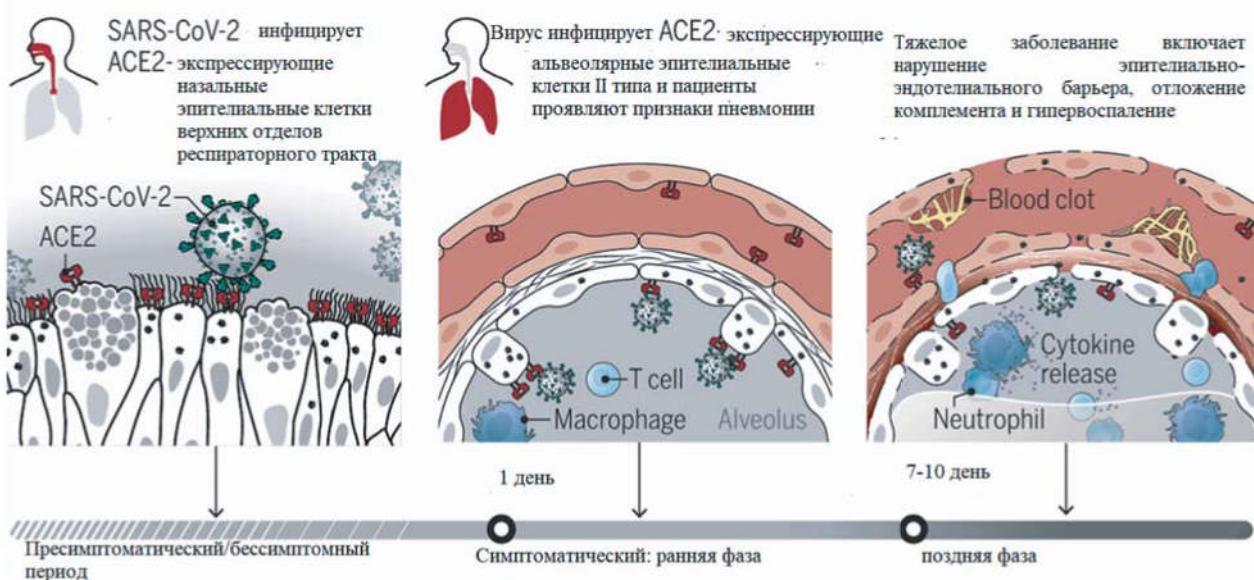


РИС. 2.

Ключевые фазы прогрессирования заболевания тяжелого острого респираторного синдрома, индуцированного коронавирусом 2 (SARS-CoV-2). На предсимптомной/бессимптомной фазе S белок вируса связывается с ангиотензин превращающим ферментом 2 (ACE2). Начальная инфекция клеток верхних дыхательных путей может протекать бессимптомно, но эти пациенты могут передавать вирус. Для тех, у кого развиваются симптомы, до 90% будут иметь пневмонию, вызванную инфекцией клеток в нижних дыхательных путях. Некоторые из этих пациентов будут прогрессировать до тяжелого заболевания, с нарушением эпителиально-эндотелиального барьера и мультиорганным поражением [№23 - Matheson NJ, Lehner PJ. How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? *Science*. 2020 Jul 31; 369(6503):510-511. doi: 10.1126/science.abc6156. PMID: 32732413]

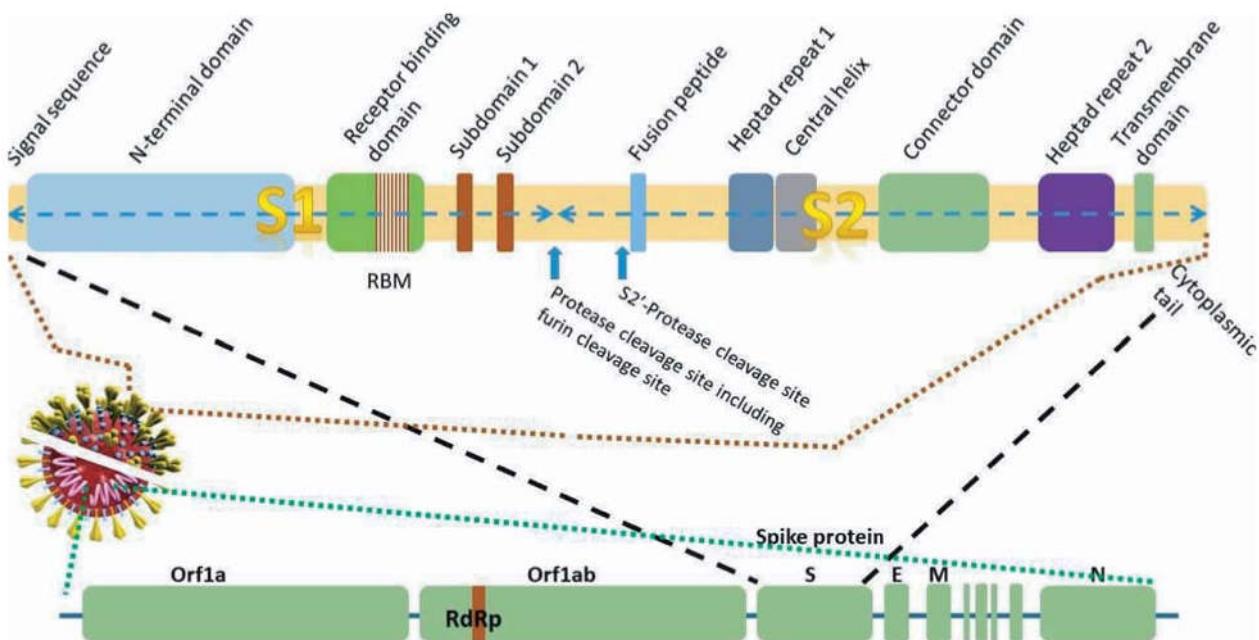


Рис. 3.

Схематическое изображение геномной структуры COVID-19 (29.3 тысяч нуклеотидов) и доменная структура шипа (гликопротеина S) коронавируса длиной в 1273 аминокислот. Е – ген оболочечного белка; М – ген мембранный белка; N – ген нуклеокапсидного белка; RBM – рецептор-связывающий домен, RdRP – РНК зависимая РНК полимераза, S – ген белка шипа [№28 - Pillay T.S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. J Clin Pathol 2020;73:366–369. doi:10.1136/clinpath-2020-206658]

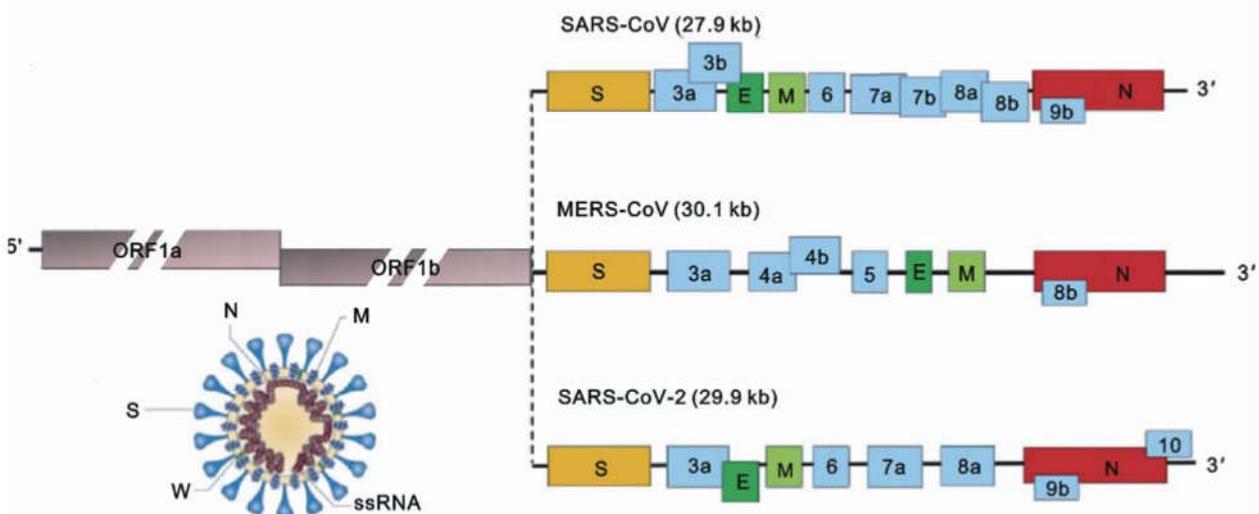


Рис. 4.

Коронавирусы формируют сферические частицы размером 100–160 нанометров в диаметре. Они содержат позитивную однолинейную РНК (ssRNA) размером от 26–32 тысяч нуклеотидов (килобаз – кб). 5' лидирующая часть SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, которая занимает две трети всего генома – ORF1a/b, кодирует полипептиды, формирующие вирусный комплекс репликации – транскриптазы. Другие ORFs на оставшейся одной трети генома, кодируют четыре основных структурных белка: спайкового (S), покровного (E), нуклеокапсидного (N) и мембранный (M) белков, так же как и ряда дополнительных белков [№19 - Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. J Pharm Anal. 2020;10(2):102-108. doi:10.1016/j.jpha.2020.03.001]

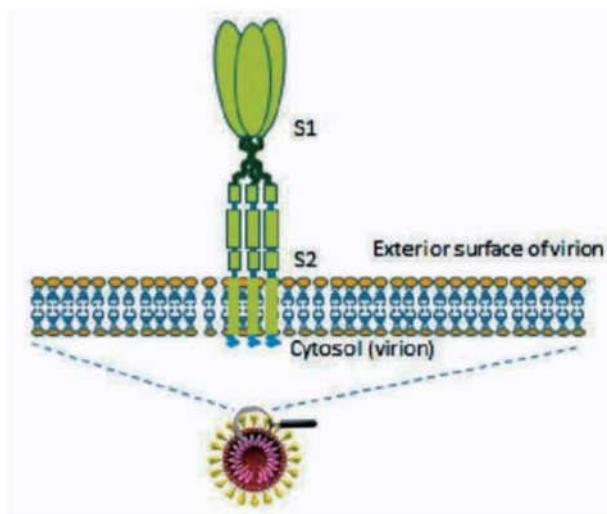


РИС. 5.

Структура шипа коронавируса [№28 – Pillay T.S. Gene of the month: the 2019 – nCoV/SARS- CoV-2 novel coronavirus spike protein. J Clin Pathol 2020;73:366–369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658]

Белок Е является наиболее распространенным структурным белком, необходимым для сборки вирусных частиц. Е-белок является самым маленьким структурным белком, несет эктодомен в N конце и эндодомен в С конце. Он также имеет домен ионного канала. Белок Е присутствует в цитозольной области инфицированных клеток и лишь в ограниченном количестве входит в оболочку вирионов. Большинство Е белков собираются в новые вирусные частицы.

Гемагглютинин-эстераза (НЕ) – димерный белок, гемагглютинирует и разрушает рецепторы. Как и другие РНК-вирусы, коронавирусы несут рецептор-связывающие домены, которые используются для эффективного прикрепления к клеткам хозяина. В настоящее время известны функциональные ферменты, связанные с такими доменами, такие как нейраминидаза (NA) и SA-O-ацетил-эстераза. SA-O-ацетил-эстераза была первоначально идентифицирована в вирусе триппа C, коронавирусах и торовирусах, а также в вирусе анемии лосося (teleost orthomyxovirus). Событие слияния S-гликопротеина и НЕ специфично для присоединения HCoV к SA-ассоциированным рецепторам в организме хозяина (рис. 6).

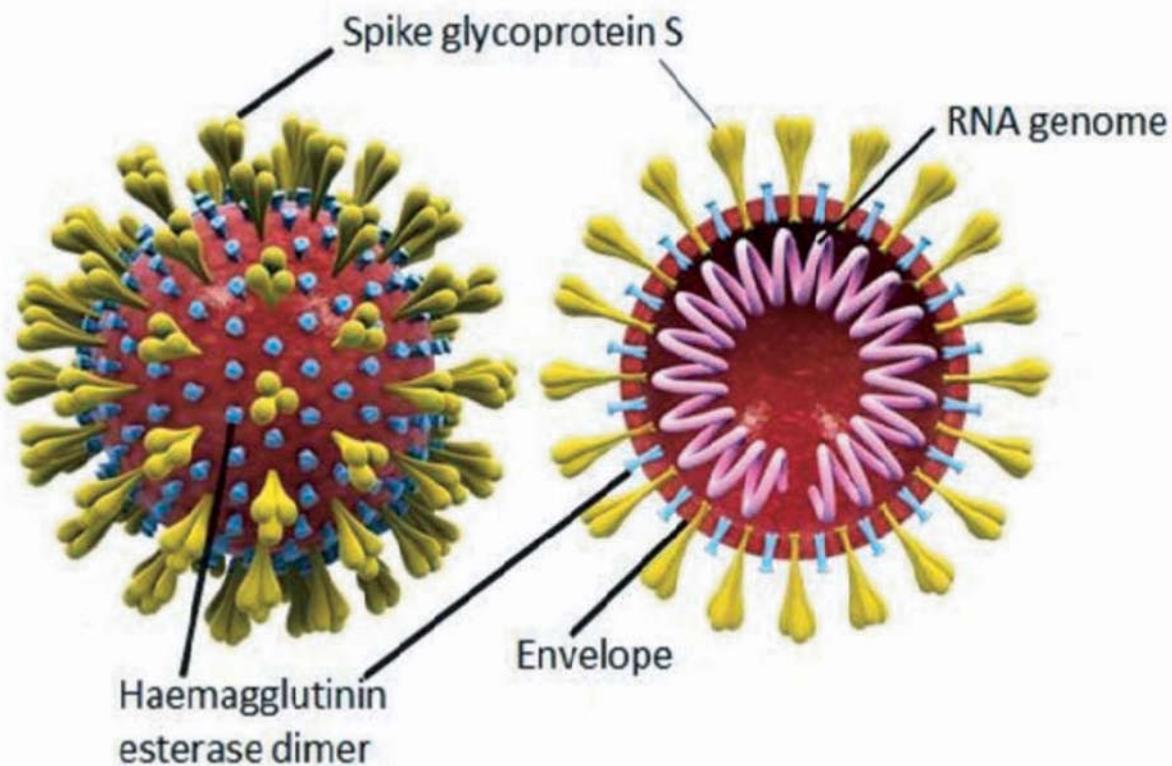


РИС. 6.

Структура вирусной частицы коронавируса [№28 – Pillay T.S. Gene of the month: the 2019- nCoV/SARS- CoV-2 novel coronavirus spike protein. J Clin Pathol 2020;73:366–369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658]

ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИРУСА В КЛЕТКУ ХОЗЯИНА

Проникновение вируса в клетку опосредовано двумя ключевыми протеолитическими стадиями. Рецептор-связывающий домен RBD (hbc/2) субъединицы S1 S-белка контактирует с анготензин превращающим ферментом (Angiotensin Converting Enzyme – ACE2), дальнейшее проникновение вируса в клетку-хозяина обеспечивается протеазами, которые катализируют расщепление S1/S2 по аргинину-667/Серину-668 (рис. 7). За этим следует расщепление S2, необходимое для слияния клеточных мембран вируса и хозяина.

Рецептор-связывающий домен (RBD) включает в себя рецептор-связывающий мотив (RBM), обеспечивающий первичный контакт с пептидным доменом ACE2. Этот RBM консервативен (50%) у SARS- S и SARS- CoV2- S, но отсутствует у SARS- связанных – CoVs, не использующих ACE2. Процесс разрезания спайк-белка реализуется в два этапа: «праймирование» разрезания и затем активация «разрезания» в сайте между S1 и S2 доменами, так же как и в сайте S2'. Сайт между доменами S1/S2 содержит множественные остатки аргинина. Хотя SARS-CoV также использует рецептор ACE2, SARS-CoV2 имеет отличный фуриновый сайт разрезания (Arg- Arg- Ala- Arg) в аминокислотных остатках 682–685, между доменами S1 и S2, отсутствующий у SARS-CoV, что может объяснять различия между их инфекционностью. Удаление этого мотива влияет на эффективность проникновения вируса в клетку хозяина. Фуриновый сайт расщепления расширяет универсальность SARS-CoV-2 расщепления этой по-

следовательности разными клеточными протеазами хозяина, благодаря широкому спектру фуриновых протеаз. Это означает, что вновь синтезированные вирионы могут секретироваться в «предактивированном» состоянии, готовом к слиянию с другими клетками и заражению ими без необходимости связываться с клеточным рецептором, таким как ACE2. В двухступенчатом последовательном процессе активационное расщепление на участке S2, как полагают, активирует белок, необходимый для слияния вирусной мембраны с клеточной мембраной. Ингибиция трансмембранный протеазы TMPRSS2 частично блокирует проникновение вируса в клетку хозяина. TMPRSS2 также имеет решающее значение для инфицирования вирусами клеток хозяина, такими как трипп A. Помимо TMPRSS2, спайковый белок SARS – CoV-2 может быть протеолитически активирован множеством других клеточных протеаз, включая катепсин B и L (эндосомальные цистеиновые протеазы). Ингибиция всего этого предотвращает проникновение вирусов. Другие протеазы, такие как фурин, эластаза, фактор X и трипсин, также способны к этому «праймирующему» протеолизу, который инициирует процесс входа вируса в клетку хозяина. Имеются данные о том, что белок SARS – CoV-2 S может вызывать протеазо – независимое и рецептор-зависимое слияние клеток для усиления вирусного распространения [26]. S1 RBD (аминокислотные остатки 333-527) SARS – CoV-2 связывается с ACE2 с более чем в 10 раз большим сродством, чем SARS – CoV. В домене RBD рецептор связывающий мотив (RBM) расположен между аминокислотными остатками 438-506.

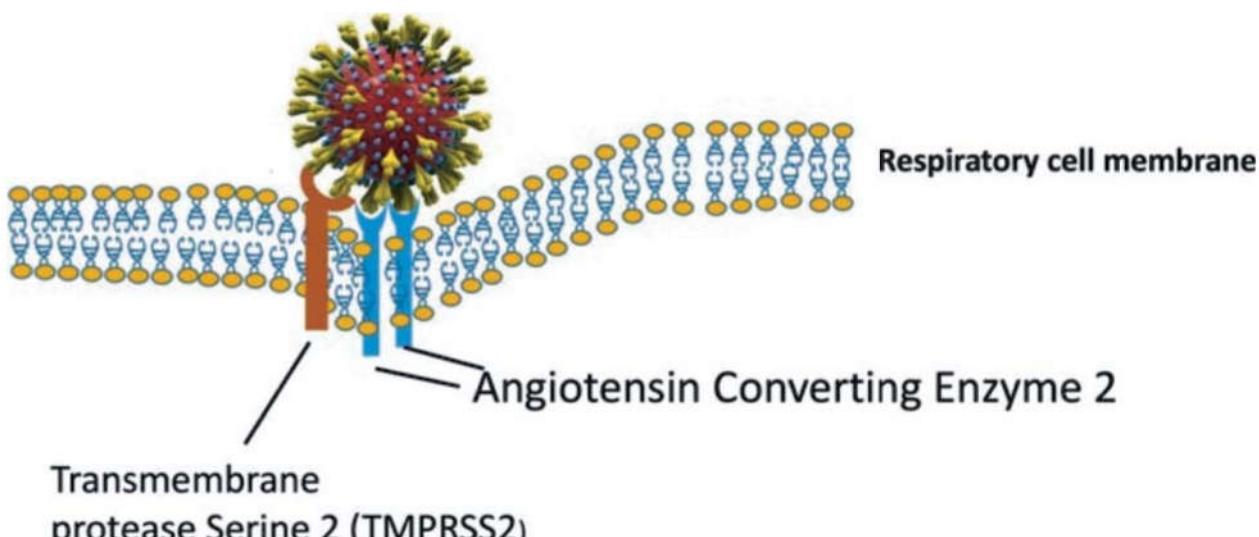


РИС. 7.

Первые этапы проникновения COVID-19 в клетку хозяина [№28 – Pillay T.S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. J Clin Pathol 2020;73:366–369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658]

КОНКУРЕНЦИЯ С БЕЛКА SARS-CoV-2 С БАЛАНСОМ ОСИ РЕНИН-АНГЕОТЕНЗИН СИСТЕМЫ (RAS)

ACE2-это дипептидилкарбоксипептидаза, которая в основном состоит из 805 аминокислотных остатков, является трансмембранным белком – ТМ, преимущественно экспрессируется в легких, сердце, почках, семенниках и желудочно – кишечном тракте. В легких ACE2 обнаруживается в клетках альвеолярного эпителия II типа (и в бронхиальном эпителии) и является рецептором для SARS-CoV, MERS – CoV и SARS-CoV-2. MERS-CoV также использует в качестве рецептора дипептидилпептидазу 4 (DPP4/CD26). Имеется вторичная циркулирующая растворимая форма ACE2. ACE2, по-видимому, имеет отличные физиологические функции от ACE, а ингибиторы ACE, используемые клинически в качестве антигипертензивных средств, не влияют на активность ACE2. Протеазная активность ACE2 не играет никакой роли в облегчении проникновения вируса, и она просто, по-видимому, действует как рецeптор, направляющий прикрепление и слияние спайкового белка с клеткой хозяина. ACE2 содержит две функциональные области, N-концевой домен M2 пептидазы и C-концевой домен коллектрина, который регулирует транспортировку аминокислот к клеточной мембране.

Физиологическая функция ACE2 заключается в преобразовании ангиотензина I в ангиотензин (1–9) и ангиотензина II в ангиотензин (1–7) (рис. 8).

Ангиотензин (1–9) связывается с рецептором Mas, что приводит к расширению сосудов и противовоспалительному эффекту (рис. 7). Это противоположно (антагонистично) ACE, который преобразует ангиотензин I в ангиотензин II. Ангиотензин II вызывает вазоконстрикцию и провоспалительные эффекты через receptor ангиотензина II типа 1. В то время как оба SARS – CoV и SARS – CoV-2 связываются с ACE2 и сайты связывания перекрываются, существуют структурные различия в обоих спайковых белках, которые влияют на характеристики связывания; например, RBM SARS – CoV-2 имеет мотив четырех остатков (Gly – Val – Glu – Gly) в позициях 482–485 в RBM, что позволяет лучше контактировать с ACE2. ACE2 содержит две «горячие» точки вируса с остатками лизина, которые, по-видимому, имеют решающее значение для связывания CoV, они создают положительные заряды, которые должны быть нейтрализованы. Два ключевых остатка в RBM SARS-CoV – 2, Gln493 и Leu455, связываются с этими «горячими» точками, что приводит к значительной стабилизации связывания и более высокому сродству к ACE2 у SARS-CoV-2.

Исследования на мышах показали, что ингибиторы ACE и блокаторы рецепторов ангиотензина повышают экспрессию ACE2. У людей антигипертензивные средства, такие как олмесартан (блокатор рецепторов ангиотензина), вызывают увеличение растворимого в моче ACE2, а сахарный диабет приводит к увеличению циркулирующего ACE2. Поэтому предполагается, что

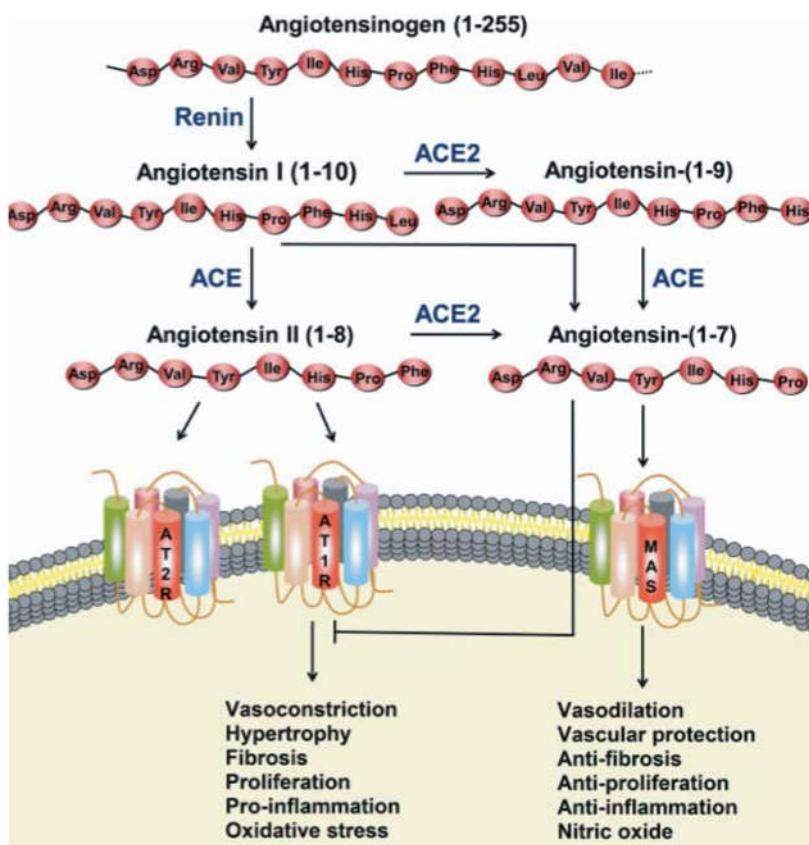


РИС. 8.

Схема ренин-анготензин системы (RAS) и осей ACE2/анготензин-(1–7)/MAS. Протеаза ренин превращает ангиотензиноген в Ang-I, который впоследствии преобразуется в Ang-II ангиотензин-превращающим ферментом (ACE). Ang-II может связываться с рецептором ангиотензина типа 1 (AT1R) для оказания таких действий, как сужение сосудов, гипертрофия, фиброз, пролиферация, воспаление и окислительный стресс. ACE2 может превращать Ang-I в Ang-II и до ангиотензина (1–7). Ангиотензин-(1–7) связывается с рецептором MAS, вызывая расширение сосудов, сосудистую защиту, антифиброз, антипролиферацию и противовоспаление. Ang-II также может связываться с рецептором ангиотензина типа 2 (AT2R) препятствуя эффектам, опосредованным AT1R [№24 - Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, Hou C, Wang H, Liu J, Yang D, Xu Y, Cao Z, Gao Z. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. Version 2. Crit Care. 2020 Jul 13;24(1):422. doi: 10.1186/s13054-020-03120-0.]

повышенная экспрессия ACE2 может потенцировать инфекцию SARS-CoV-2. В то же время, повышенная растворимость ACE2 может препятствовать связыванию SARS-CoV-2 с клетками и ослаблять повреждение тканей. Так, в клеточных культурах человека введение растворимого рекомбинантного ACE2, объединенного с IgG1 для стабилизации, блокирует размножение SARS-CoV-2 [16].

В то же время, представлены данные, свидетельствующие о том, что S белок COVID-19 может взаимодействовать и с другим белком хозяина, нейропилином-1 (NRP1) – пептидазой, опознающей фуриновую последовательность для разрезания, наличием которой отличается S белок SARS-CoV-2 от SARS-CoV-2 и способствующий распространению вируса в капиллярах и ольфакторному нозальному эпителию и, по-видимому с другими элементами ЦНС [2, 23].

СИСТЕМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОЛОВЫМИ ГОРМОНАМИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ИНФИЦИРОВАНИЮ ВИРУСОМ SARS-COV-2

Накапливаются данные о выраженных возрастных и половых отличиях по развитию тяжелых форм атипичной пневмонии и летальных исходах у людей, инфицированных COVID-19. Их частота выше на 60% у людей, старше 60-ти лет по сравнению с детьми младшего возраста. У женщин летальные последствия обнаруживаются у 1,7% по сравнению с 2,8% у мужчин. По данным госпиталя Гонконга 32% мужчин и 15% женщин, инфицированных COVID-19, нуждаются в интенсивном лечении или гибнут [10]. На модельном объекте, на мышах, показано, что гонадэктомия не меняет чувствительность самцов, но овариектомия или антагонисты рецепторов эстрогенов увеличивают смертность самок после заражения SARS-CoV [4]. Это наблюдение также полностью согласуется с тем фактом, что самки обладают более сильными врожденными и адаптивными иммунными реакциями, относительно более устойчивыми к вирусным инфекциям, чем самцы. Разница в количестве копий X-связанных генов, участвующих в иммунном ответе и чувствительности самцов и самок, может объясняться и другими возможными факторами. Известно, что тестостерон подавляет реакции врожденного иммунитета, в то время как эстрогены обладают иммunoупрессивной активностью на более высоких уровнях и иммуностимулирующей активностью на более низких уровнях [29, 30, 22, 27].

Сложные взаимоотношения между разными путями превращений анготензина (RAS, рис. 8) привлекают особое внимание к ACE2 и сериновой протеазе TMPRSS2 (рис. 7). Экспрессия TMPRSS2 контролируется андрогенами. Металлопептидазный домен 17 (ADAM17, расщепляет мембранный предшественник TNF-альфа до его зрелой растворимой формы, отвечает за протеолитическое высвобождение

Г.В. ГЛАЗКО, Г.Ю. КОСОВСКИЙ,
Б.А. ЗЫБАЙЛОВ, В.И. ГЛАЗКО, Т.Т. ГЛАЗКО
ГЕНЕТИКА, ГЕНОМИКА
И МЕТАГЕНОМИКА COVID-19

растворимого JAM3 с поверхности эндотелиальных клеток и ряда других белков клеточной поверхности, включая P75 TNF-рецептор, интерлейкин 1 receptor типа II, P55 TNF-рецептор, трансформирующий фактор роста-альфа, L-селектин, рецептор гормона роста, MUC1 и белок-предшественник амилоида. Действует как активатор Notch-пути, опосредуя расщепление Notch, генерируя связанный с мембраной промежуточный фрагмент, называемый Notch extracellular truncation (NEXT). Участвует в протеолитической обработке ACE2. Эстрогены повышают уровни экспрессии ADAM17 и ADAM10 – две протеазы, принимающие участие в выщеплении многих эктодоменов.

Множественные генные сети, вовлекаемые в ответ на контакт с инфекционным агентом, SARS-CoV-2.

В общем, имеется много генов, вовлекаемых в регуляцию оси ACE2/Ang1-7/Mas (рис. 8). ADAM17, способствуя отщеплению эктодомена рецептора ACE2, может разрушать ее регуляцию, а локусы SRY (Y-хромосома) и SOX3 (Х-хромосома) как за счет повышения титра AGT (анготензиноген), так и за счет снижения ACE2, AT2 и MAS. И наоборот, SRY повышает экспрессию, в то время как SOX3 понижает экспрессию ренина (REN), что потенциально ограничивает скорость и реактивность системы RAS, которая особенно слаба у мужчин.

В литературе представлены данные, свидетельствующие о вовлечении большого количества метаболических путей в ответ на инфицирование человека вирусом COVID-19. Одно из обобщений таких данных по отношению к неструктурным белкам вируса COVID-19, которые вмешиваются в определенные метаболические пути хозяина, представлено в табл. 1.

Выполненный нами анализ ассоциаций между предположительно основной мишенью связывания S белка с клетками хозяина - ACE2, с другими белками хозяина позволяет представить сети этих ассоциаций на разных уровнях – белки первого круга, вступающие в прямую ассоциацию с ACE2 (рис. 9.1), белки второго круга, вступающие в ассоциацию с белками первого круга (рис. 9.2), и белки третьего круга, вступающие в ассоциации с белками второго круга (рис. 9.3). В этих взаимодействиях можно увидеть два принципиальных момента. Первый, это тот факт, что само взаимодействие S белка вируса с ACE2 вмешивается в целые каскады метаболических путей, имеющих сложную, многомерную структуру взаимодействий, второе – что все эти взаимодействия, в большинстве своем, имеют обратные связи и каждый акт межбелковых взаимодействий может иметь плохо прогнозируемые последствия «маятника», что свойственно и самому балансу ACE2/анготензин-(1-7)/MAS оси (рис.9), изменения которого при одних и тех же участниках может приводить к разным физиологическим последствиям.

В процессе создания карты белок-белковых взаимодействий между белками вируса COVID-19 и

ТАБЛИЦА 1.

Функции неструктурных белков (ncp) коронавируса [Malik Y. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. Malaysian J Pathol 2020; 42(1): 3–11]

Белок	Функции
nsps1	Промотирует деградацию клеточной РНК и блокирует трансляцию РНК клеток хозяина, ассоциирован с подавлением врожденного иммунитета
nsps2	Функции неизвестны, связывается с прохихитиновыми белками (присутствуют в разных клеточных компартиментах, таких как митохондрии, ядра, цитоплазма и плазматическая мембрана, и играют роль в регуляции транскрипции, апоптоза, и биогенеза митохондрий)
nsps3	Большой мультидоменный трансмембранный белок, его активность включает: Ubl1 и Ac домен, взаимодействует с N, белком аденоzin дифосфат рибоза 1 фосфатазой (ADRP), что промотирует экспрессию цитокинов, домен PLPro/деубиквитиназа разрезает вирусные полипротеины, подавляет ответ врожденного иммунитета Ubl2, NAB, G2M, SUD, Y домены с неизвестной функцией
nsps4	Потенциальный трансмембранный каркасный белок, важный для правильной структуры DMVs
nsps5	Mpro – протеаза, разрезающая полипротеины вирусов
nsps6	Потенциальный трансмембранный каркасный белок
nsps7	Образует гексадекамерный комплекс с nspr8, может выступать в качестве поддержки в процессе при работе РНК-полимеразы
nsps8	Образует гексадекамерный комплекс с nspr7, может выступать в качестве поддержки в процессе при работе РНК-полимеразы, может действовать как праймаза
nsps9	Белок, связывающийся с РНК
nsps10	Кофактор nspr16 и nspr14, формирующий гетеродимер с обоими и стимулирует ExoN и 2'-О-МТ активность (нуклеозид-2'-О-метилтрансфераза)
nsps12	RdRp (РНК зависимая РНК полимераза /геликаза (Hel),
nsps13	РНК геликаза, 5' трифосфотаза
nsps14	N7 MTase) и 3'-5' экзорибонуклеаза, ExoN; N7 MTase добавляет 5' кеп к вирусной РНК, ExoN активность важна для коррекции вирусного генома
nsps15	Вирусная эндорибонуклеаза, NendoU
nsps16	2'-О-МТ; защищающий вирусную РНК от опознавания MDA5

Примечание: Ubl – убиквитинподобный; Ac – кислый; ADRP – АДФ-рибоза-1'-фосфат; PLPro – папаин подобная протеаза; NAB – домен связывания с нуклеиновой кислотой; SUD – SARS-универсальный домен; DMVs – двумембранные везикулы; Mpro – главная протеаза; RdRp – РНК зависимая РНК полимераза; MTase – метилтрансфераза; вирусная экзонуклеаза – ExoN; вирусная эндорибонуклеаза – NendoU; 2'-О-МТ - 2'-О-метилтрансфераза; MDA5 – белок 5, ассоциированный с дифференциацией меланомы.

клетками человека выявлены 332 высоконадежных белок-белковых взаимодействий между белками SARS-CoV-2 и белками человека [11]. Среди них ведется поиск наиболее эффективных мишенией для разработок антивирусных препаратов. Такой белковый «интерактом» позволяет выявлять вирусные белки и белки хозяина, блокада которых могла бы быть эффективной для остановки инфекционного процесса или, по крайней мере, ограничения размножения вируса. В то же время очевидно, что такой двумерный анализ межбелковых взаимодействий нуждается в переходе на надклеточный уровень и выявление его основных изменений у инфицированных COVID-19 людей.

Пути формирования синдрома диссеминированной внутрикапиллярной коагуляции (DIC)

К настоящему времени накоплено большое количество данных о взаимодействиях между иммунной системой хозяина и COVID-19 вирусом. Предполагается, что само время развития тяжелого состояния после инфицирования (7–10 дней, рис. 2) свидетельствует о роли адаптивного иммунитета в этом процессе.

В то же время, нарушения капиллярного эндотелия может быть результатом прямого повреждения эндотелиальных клеток в связи с проникновением в них вируса и его размножением, либо следствием иммунно-опосредованных процессов. Наиболее очевидным виновником фазы тяжелого заболевания является сам вирус, либо сам по себе, либо с патологиями иммунной системы. Разрушение легочного эпителиально-эндотелиального барьера может спровоцировать повреждение эндотелия и вирусную диссеминацию.

Эндотелий капилляров (ЭК), окруженный муральными клетками (перицитами), поддерживает целостность сосудов и барьерную функцию. Он предотвращает воспаление, ограничивая взаимодействие ЭК с иммунными клетками и ЭК – тромбоцитами, и ограничивает свертывание крови, экспрессируя ингибиторы свертывания и ферменты лизиса сгустков крови, продуцируя гликокаликс (защитный слой гликопротеинов и гликолипидов) с антикоагулянтными свойствами. Легочные осложнения возникают в результате нарушения сосудистого барьера, приводящего к отеку

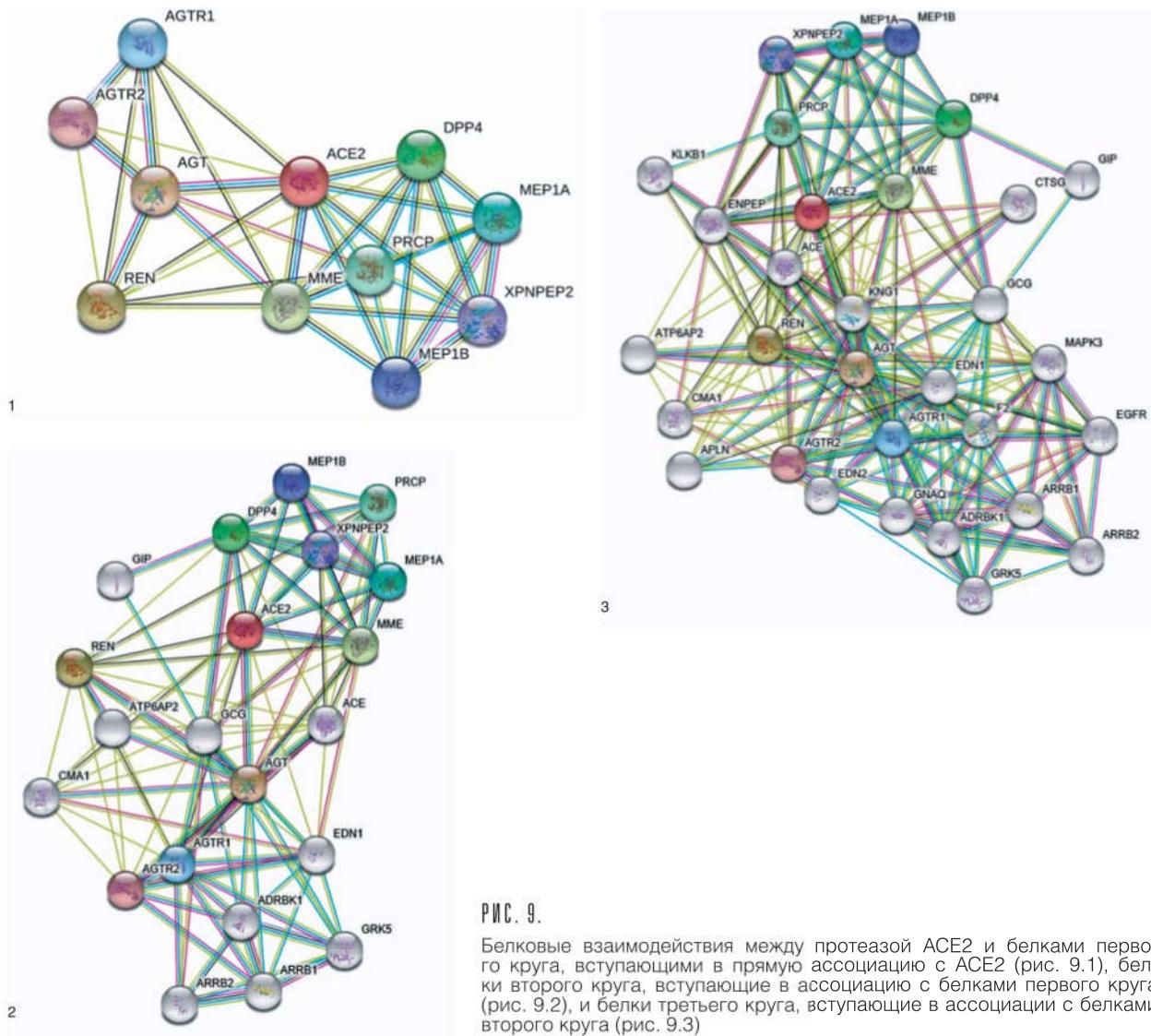


Рис. 9.

Белковые взаимодействия между протеазой ACE2 и белками первого круга, вступающими в прямую ассоциацию с ACE2 (рис. 9.1), белки второго круга, вступающие в ассоциацию с белками первого круга (рис. 9.2), и белки третьего круга, вступающие в ассоциации с белками второго круга (рис. 9.3)

тканей (вызывающему накопление жидкости в легких), эндотелииту, активации путей свертывания крови с потенциальным развитием диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и нерегулируемой воспалительной клеточной инфильтрации.

Можно ожидать, что отек легких у пациентов с тяжелым COVID-19 обусловлен несколькими механизмами (рис. 10, цитируется по [31]. Во-первых, вирус может непосредственно влиять на ЭК, так как у больных с атипичной пневмонией инфицированные ЭК были обнаружены в нескольких органах умерших пациентов. Такие ЭК проявляли широко распространенный эндотелиит, характеризующийся дисфункцией ЭК, их лизисом и смертью. Во-вторых, чтобы попасть в клетки, SARS-CoV-2 связывается с рецептором ACE2, что ухудшает активность ACE2. Снижение активности ACE2 косвенно активирует калликреин-брadiкининовый путь, повышая проницаемость

сосудов. В-третьих, активированные нейтрофилы, рекрутируемые в легочную ЭК ткань, производят гистотоксические медиаторы, включая активные формы кислорода (ROS). В-четвертых, иммунные клетки, воспалительные цитокины и вазоактивные молекулы приводят к усилиению сократительной способности ЭК и ослаблению межэндотелиальных связей. В свою очередь, это приводит к щелям между эндотелиальными клетками. Наконец, цитокины IL-1 β и TNF активируют глюкуронидазы, которые не только разрушают гликокаликс, но и повышают активность синтазы гиалуроновой кислоты 2, что приводит к увеличению отложения гиалуроновой кислоты во внеклеточном матриксе и способствует задержке жидкости. Вместе эти механизмы приводят к повышению проницаемости сосудов.

Установленной особенностью тяжелого течения COVID-19 является активация путей свертывания

крови с возможным развитием синдрома диссеминированной внутрикапиллярной коагуляции (DIC) [12]. Это также связано с активацией и дисфункцией ЭК, поскольку нарушение целостности сосудов и гибель ЭК сопровождаются обнажением тромбогенной базальной мембранны и приводят к активации каскада коагуляции. Кроме того, ЭК, активированные IL-1 β и TNF, инициируют свертывание крови путем экспрессии P-селектина, фактора фон Виллебранда и фибриногена, с которыми связываются тромбоциты. В свою очередь, ЭК высвобождают трофические цитокины, которые еще больше усиливают выработку тромбоцитов. Тромбоциты также высвобождают VEGF, который индуцирует ЭК к экспрессии тканевого фактора, основного активатора каскада свертывания крови. По системе обратной связи в свою очередь это индуцирует контратмеры для растворения богатых фибрином сгустков крови и такая индукция делает понятным, почему высокий уровень продуктов распада фибринна (D – димеры) являются предсказателем плохого исхода заболевания. В результате DIC-синдрома и закупорки мелких капилляров, а также возможного тромбоза в более крупных сосудах развивается ишемия легочной ткани, которая провоцирует ангиогенез и потенциальную гиперплазию ЭК. В то время как последнее может усугубить ишемию, ангиогенез может быть спасительным механизмом для минимизации ишемии. Однако вновь образованные сосуды могут также способствовать воспалению, действуя как проводники для воспалительных процессов, которые привлекаются активированными ЭК.

Следует отметить также, что тяжелое течение SARS-CoV-2 тесно связано с различными коагулопатиями, которые могут привести либо к кровотечению и тромбоцитопении, либо к гиперкоагуляции и тромбозу. Эти патологии являются значимыми сопутствующими факторами острого респираторного синдрома и легочных осложнений у COVID-19 инфицированных пациентов. Особый интерес представляют различные циркулирующие воспалительные биомаркеры свертывания крови, непосредственно участвующие в свертывании крови, такие как фибриноген, D-димер, P-селектин и фактор фон Виллебранда (VWF). Центральное место в активности этих биомаркеров занимают их рецепторы и сигнальные пути на эндотелиальных клетках, тромбоцитах и эритроцитах [13].

VWF экспрессируется ЭК и мегакариоцитами и присутствует, соответственно, в тромбоцитах. VWF участвует в контакте ЭК с тромбоцитами, вовлечены в тромбоагрегацию и тромбообразование, а также действует как транспортер и стабилизатор прокоагулянтного фактора VIII (FVIII). Если уровень VWF повышен, это свидетельствует о повышенной вероятности формирования тромбов, если понижен – вероятности кровотечения.

На поздних стадиях заболевания COVID-19 уровень VWF часто понижен, что обусловлено крупномасштабными повреждениями эндотелия капилляров [13]. Следует отметить, что чем больше эндотелиальных клеток будет разрушено, с которыми, с участием VWF, могли бы связываться тромбоциты, тем более крупные сообщества тромбоцитов будут связываться друг с другом, с участием того же фактора и, таким образом, способствовать формированию синдрома DIC.

Относительно повышенная частота инсультов у инфицированных COVID-19, по мнению ряда авторов, может быть обусловлена, по крайней мере, двумя причинами [1]: нарушение гематоэнцефалического барьера за счет прямого повреждения эндотелиальных клеток капилляров и провоцирование в таких участках синдрома DIC, и второй вариант – сдвиг баланса ренин-ангиотензиновой системы (RAS) за счет пониженной доступности на эндотелиальных клетках рецепторов ACE2, занятых S белком вируса SARS-CoV-2, что приводит к нарушению мозгового кровотока.

Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о том, что ключевыми событиями в переходе инфицированных пациентов к тяжелым стадиям развития заболевания, вызванного инфицированием SARS-CoV-2, могут быть выраженность синдрома DIC и нарушение равновесного состояния RAS. Обращает на себя внимание тот факт, что оба явления непосредственно зависят от количества вирусов, индуцирующих гибель эндотелиальных клеток, провоцирующих DIC и/или смещающих баланс RAS, а также от генетически обусловленного сродства белков хозяина по отношению к белкам вируса, вступающим с ними в контакт.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУННОЙ РЕАКЦИИ НА КОНТАКТ С ВИРУСОМ SARS-COV-2

Анализ динамики клеток иммунной системы, который привел многих авторов к предположению о том, что одной из причин фаз развития самого заболевания в связи с COVID-19 (рис. 2), является дисфункции адаптивного иммунитета, что проявляется в снижении количества лейкоцитов через 7–10 дней после инфицирования. Выполнен анализ изменений Т и В лимфоцитов в процессе развития COVID-19 в двух разных условиях – без внешних воздействий и после введения низкомолекулярного гепарина (low-molecular-weight heparin – LWMH) и внутривенного введения высоких доз иммуноглобулина (intravenous immunoglobulin – IVIg) [3]. В результате получены данные, свидетельствующие о том, что предложенная терапия очень быстро влияет на основные клеточные элементы адаптивного ответа (рис. 11).

Судя по представленным на рис. 11 данным, антикоагулянты, иммуноглобулины не приводят к пол-

ной отмене падения численности Т и В лимфоцитов, повышения маркеров воспаления, Д димеров. Это свидетельствует против предположения о том, что изменения контролируемых параметров может быть обусловлено рекрутацией таких клеточных элементов, как Т и В, в очаги воспаления.

При ретроспективном анализе получены данные о том, что пациенты с хорошим прогнозом имели более высокие частоты подмножеств клеток с маркерами CD3 + CD4+CD45RO+CXCR3+ по сравнению с пациентами с плохим прогнозом [35]. Это подмножество может быть обозначено как вспомогательные Т-клетки памяти типа 1 (Th1), выполняющие ключевую роль в успешном контроле SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2.18 и, более того, экспансия антигенспецифических CD8+ Т-клеток в зависимости от Th1-клеток оказывает значительное влияние на клиренс вируса. Общее количество естественных киллерных клеток и CD8+ Т-клеток заметно снижается у пациентов с инфекцией SARS-CoV-2.20.

Дендритные макрофаги (DC) являются наиболее мощными полноценными антигенпрезентирующими клетками (APCs), и они могут эффективно поглощать, обрабатывать и представлять антигены. Оказалось, что пациенты с хорошим прогнозом имели более высокие частоты CD14+CD11C+HLA-DR+ подмножества DC, чем пациенты с плохим прогнозом. Количество нейтрофилов было значительно увеличено в группе с плохим прогнозом. Повышенное количество нейтрофилов зарегистрировано у пациентов с критическим COVID-19 в момент обострения, группа с плохим прогнозом имела относительно более высокие уровни нативных CD4+ Т-клеток, Tregs и Th2-клеток, чем группа с хорошим прогнозом. Сходные данные получены и при других ретроспективных исследованиях, свидетельствующие о связи плохого прогноза у пациентов с подавлением разных звеньев адаптивного ответа [37]. В некоторых исследованиях отмечается повышение функциональной активности клеток адаптивного ответа на ряду с уменьшением их количества [34].

Регуляторные Т-клетки (Treg), типа CD4CD25Foxp3, являются важными популяциями тимус-зависимых клеток, ограничивающих иммунные реакции и поддерживающих иммунный гомеостаз хозяина. Treg клетки экспрессируют иммуноглобулин цитотоксический Т-лимфоцит антиген 4 (CTLA-4), рецептор интерлейкина (IL)-2 CD25, а также производят ингибирующие цитокины, такие как IL-10 и трансформирующий фактор роста TGF- β . IL-10 индуцирует экспрессию лиганда запограммированной смерти-1 (PD-L1), который действует как лиганд для иммуно-ингибирующего рецептора PD-1 в дендритных клетках, нарушает сигналы активации от CD28 и ингибирует активацию Т-клеток. Аналогично, TGF- β ингибирует функции Т-клеток и антиген-презентирующих клеток частично путем

ингибирования основных транскрипционных факторов Th1 и Th2, Tbet и GATA3. TGF- β усиливает развитие Treg путем индукции Foxp3 и ингибирует цитотоксичность естественных киллерных (NK) клеток после активации IL-2, IL-15, IL-21 и IFN I. Хотя Treg клетки важны для иммунного гомеостаза хозяина, они способствуют прогрессированию некоторых хронических заболеваний, подавляя иммунные реакции. Соответственно, Treg клетки человека, инфицированного вирусом иммунодефицита, ингибируют эффекторные функции, в том числе продукцию IFN- γ и цитотоксичность. Повышенное количество Treg коррелировало с распространением вируса при заражении вирусом иммунодефицита обезьян (SIV). TGF- β участвует в механизмах инфекционной толерантности, положительно коррелирует с уровнем вируса гепатита В у инфицированных пациентов. Таким образом, Treg клетки, участвуя в подавлении иммунного ответа, могут способствовать персистенции вирусных инфекций [25].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что Treg-клетки могут приобретать эффекторную функцию и вносить свой вклад в патогенез воспалительных заболеваний, производя эффекторные цитокины 1-го типа (IFN- γ) или 17-го типа (IL-17), или трансдифференцируясь в фолликулярные хелперные клетки (Tfh) в бляшках Пейера.

Трансформирующий фактор роста TGF- β – плейотропный цитокин, регулирует ряд биологических процессов, включая эмбриогенез, заживление ран, ангиогенез и регуляцию иммунитета. Само название этого белка говорит о том, что одна из основных его функций – способность участвовать в эпителиально – мезенхимальных переходах, существенно влияя на межклеточные взаимодействия, клеточную подвижность.

У млекопитающих TGF- β имеет три различные изоформы: TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3, из которых TGF- β 1 служит преобладающей формой, обнаруженной в иммунных клетках. TGF- β 1-дефицитные мыши развиваются избыточные мультиорганные аутоиммунные фенотипы в раннем возрасте и умирают в течение 3–4 недель после рождения, что указывает на существенную роль TGF- β 1 в предотвращении аутоиммунитета на периферии. TGF- β 1 синтезируется в неактивной форме предшественника, состоящей из димера зрелого TGF- β 1, окруженного латентно-ассоциированным пептидом (LAP). Активация латентного TGF- β 1 путем вовлечения интегрина, такого как avB8, экспрессирующегося в миелоидных клетках, приводит к высвобождению зрелого TGF- β 1 после протеолиза LAP. TGF- β 1 тесно связан с развитием, функцией и стабильностью клеток Treg [6].

В то же время, плейотропность TGF- β 1 реализуется и в его участии в формировании легочного фиброза [8]. TGF- β высоко экспрессируется почти во всех

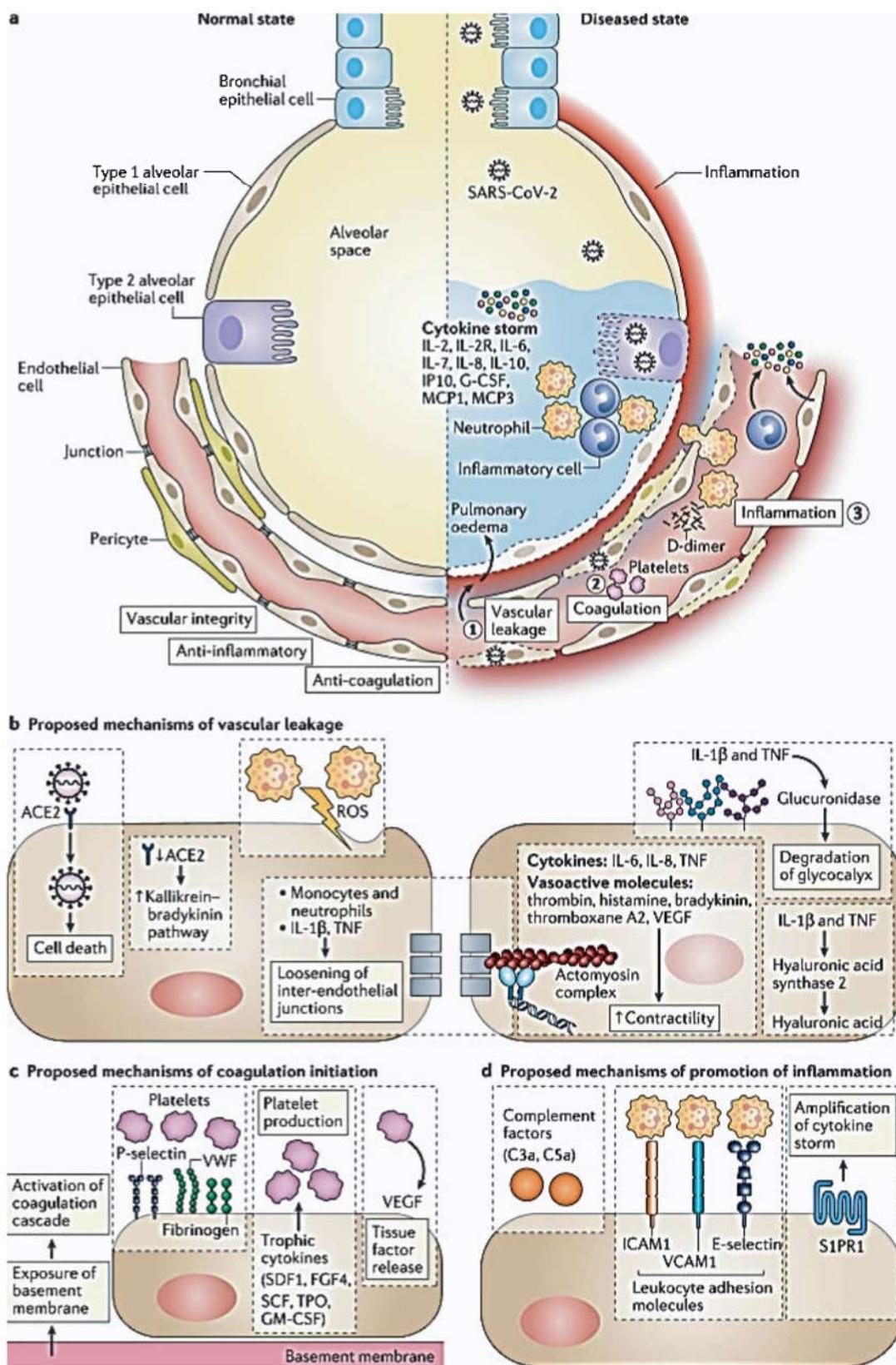


РИС. 10.

Слева изображена нормальная граница раздела между альвеолярным пространством и эндотелиальными клетками; справа выделены патофизиологические особенности коронавирусной болезни легких (COVID-19), включая потерю целостности сосудов (1), активацию пути свертывания крови (2) и воспаления (3). В-д – представлены предлагаемые механизмы, способствующие развитию специфических реакций эндотелиальных клеток. ROS - реактивные формы кислорода; S1PR1 - сфинкгозин 1 фосфат рецептор; VWF - фактор фон Виллебранда [№31 - Teuwen, L., Geldhof, V., Pasut, A., Carmeliet, P. COVID-19: the vasculature unleashed. Nat Rev Immunol 20, 389–391 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0343-0>]

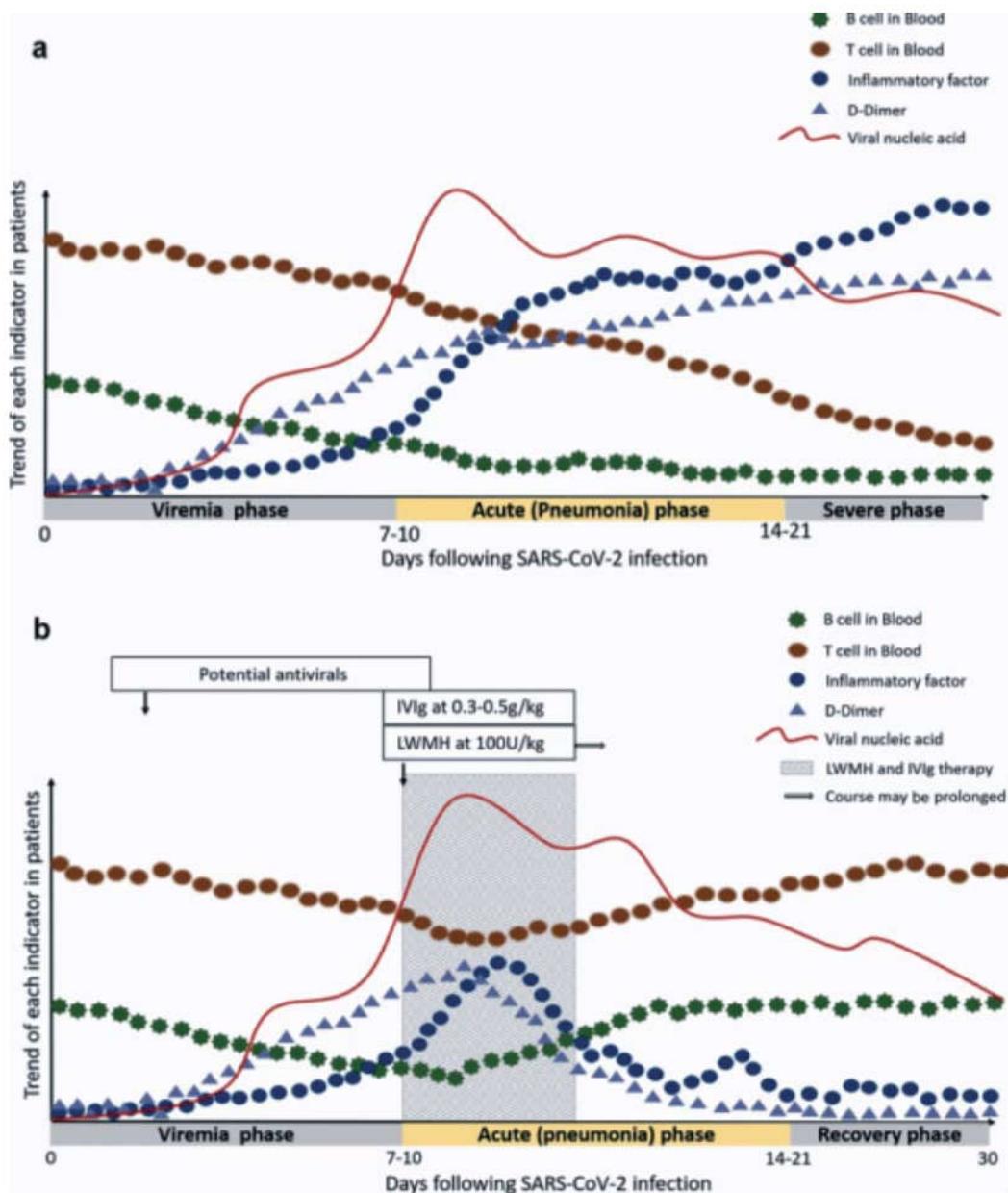


Рис. 11.

Динамика Т и В лимфоцитов у пациентов с тяжелым течением COVID-19 в связи с применением антикоагулянтов и иммуноглобулинов. На оси X отложены дни после заражения SARS-CoV-2. Течение болезни делится на три фазы – наличие вируса в крови (виреемия), острая пневмония, тяжелая фаза (в случае «а») и фаза выхода (в случае «б»). На оси Y отложены тенденции изменений Т-клеток, В-клеток, факторов воспаления, Д-димера и вирусной нагрузки у пациентов. а – тренд каждого показателя у тяжелых больных COVID-19. б – динамика каждого показателя у пациентов с тяжелой формой COVID-19 после низкомолекулярного гепарина (LWMH) и высокодозной внутривенной иммуноглобулиновой терапии (IVIg). Заштрихованные области представляют рекомендуемое время вмешательства для LWMH и IVIg терапии. [N3 - Cao, W., Li, T. COVID-19: towards understanding of pathogenesis. Cell Res 30, 367–369 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0327-4>]

фиброзных процессах, действующий как мощный профиброгенный цитокин. Помимо хорошо узнаваемого Smad-зависимого каскада (внутриклеточные посредники передачи к ядру сигналов от лигандов, связывающихся с TGF- β), существуют кумулятивные данные, указывающие на то, что уровень ROS также модулирует такую сигнализацию через Smad-неза-

висимые пути. TGF- β и ROS вовлечены в порочный круг. С одной стороны, TGF- β способствует окислительно-восстановительному дисбалансу, повышая уровень ROS и подавляя антиоксидантные ферменты. С другой – ROS индуцирует TGF- β , тем самым способствуя его участию в фиброгенезе. Интересно, что гептапептид Ang1-7 способен вмешиваться в этот

путь, уменьшая вызванную AngII экспрессию белков Smad и транспорт в ядро pSmad2 / 3, а также снижая уровень фосфорилирования сигнальных путей PI3K (фосфоинозитид-3-киназы), Akt, p38-MAPK (митоген активированная протеинкиназа) и JNK (c-Jun N-концевая киназа). При легочном вирусном инфекционно-индуцированном фиброзе повышается окислительный стресс в эпителиальных клетках, что стимулирует выработку и высвобождение TGF- β , вызывая чрезмерную миграцию, пролиферацию, активацию и миофибробластическую дифференцировку фибробластов (рис. 12, [8]).

Появление данных о связи экспрессии TGF- β и фиброзах легкого у инфицированных SARS-CoV-2 позволило сформулировать предположение об участии этого цитокина в тяжелой фазе развития COVID-19 и возможное направление терапии, основанное на блокаде TGF- β [5]. Автор полагает, что массивное увеличение активного TGF- β в легких может быть результатом, по крайней мере, трех возможных источников.

1) Вирусная инфекция SARS-CoV-2 и последующие иммунные и воспалительные реакции, а также нарушение регуляции свертывающего и фибринолитического путей, индуцируют массивную активацию латентного TGF- β в легких, а также латентного пула TGF- β в крови пациентов.

2) Вирусная инфекция SARS-CoV-2 индуцирует массивное увеличение инфильтрации нейтрофилов в легкие, где нейтрофилы могут высвобождать накопленный TGF- β , который может быть активирован эластазой в нейтрофилах.

3) Вирусная инфекция SARS-CoV-2 вызывает апоптоз эпителиальных клеток бронхов, пневмоцитов и Т-лимфоцитов. Вирус также может привести к гибели нейтрофилов. Увеличивается миграция макрофагов в легкие, где они поглощают и переваривают эти апоптотические клетки. Это, следовательно, приводит к выделению латентного (и активного) TGF- β в легкие. Продуцируемый латентный TGF- β может быть дополнительно активирован местными протеазами, такими как фуриновая протеаза, плазмин и эластаза, активные формы кислорода (ROS), металлопротеиназы и интегрины, такие как aV β 6.

В результате внезапное и неконтролируемое повышение активности TGF- β (возможно, с помощью некоторых провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-6 и IL-1 β) неизбежно приводит к быстрому и массивному отеку и фиброзу, которые в конечном итоге блокируют дыхательные пути, что угрожает функциональной недостаточностью легких и смерти больных. В то же время, как уже отмечалось выше, повышение экспрессии TGF- β является одним из широко распространенных путей подавления иммунной реактивности при различных вирусных инфекциях.

МИКРОБИОМ У ИНФИЦИРОВАННЫХ SARS-COV-2

Обнаружено, что у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, существенно меняется состав микробиома и в легких [38], и в кишечнике [14]. В некоторых работах отмечается, что при заражении клеток человека SARS-CoV-2 через ACE2 в качестве рецептора, происходит расщепление ACE2 трансмембранными протеазами, что приводит к снижению его активности. В то же время, кишечный ACE2 функционирует как шаперон для переносчика аминокислот B0AT1. Предполагается, что комплекс B0AT1/ACE2 в кишечном эпителии регулирует состав и функцию кишечной микробиоты (GM), влияя на местные и системные иммунные реакции против патогенных агентов, в том числе и вирусов. Представлены данные, связывающие нарушение функций ACE2 с неблагоприятными исходами (более высокая тяжесть заболевания и смертность) у пациентов COVID-19 с уже существующими возрастными сопутствующими заболеваниями, рассматривается возможная роль дисбактериоза GM (рис. 13) [33].

Предполагается, что изменения в составе и функциональной активности кишечной микробиоты могут быть биомаркерами тяжести заболевания. Можно ожидать, что разработка методов адресного управления разными компонентами микробиоты кишечника может сформировать новое направление терапевтических стратегий в преодолении тяжелых состояний вирусных инфекций [32]. В этой связи выполняются исследования немедикаментозных веществ, таких как пищевые добавки, пробиотики и нутрицевтики, в целях снижения риска инфекции SARS-CoV-2 или смягчении симптомов COVID-19. Эти вещества могли бы иметь многочисленные преимущества в нынешних условиях, как правило, они легко доступны и имеют незначительные побочные эффекты, если их вводить в уже используемых и испытанных дозировках. Некоторые бактериальные и молекулярные продукты могут оказывать влияние на иммунный ответ при инфицировании респираторными вирусами. Они также могут выполнять регуляторную роль в системном воспалении или повреждении эндотелия, что является двумя важнейшими аспектами COVID-19 [15].

К настоящему времени уже получен ряд обнадеживающих данных, свидетельствующих о том, что использование бактериальной терапии может оказывать благоприятное воздействие на течение инфекции SARS-CoV-2. Так, две группы пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, сопоставимые по возрасту, полу, лабораторным показателям, сопутствующим патологиям и способам кислородной поддержки были подразделены на получавшую бактериотерапию и условно контрольную группу. В течение 72 ч почти у всех пациентов, получавших бактериотерапию, наблюдалась ремиссия диареи и других симптомов по сравнению с менее чем половиной другой группы. Ожидаемый риск развития дыхательной недостаточности был в

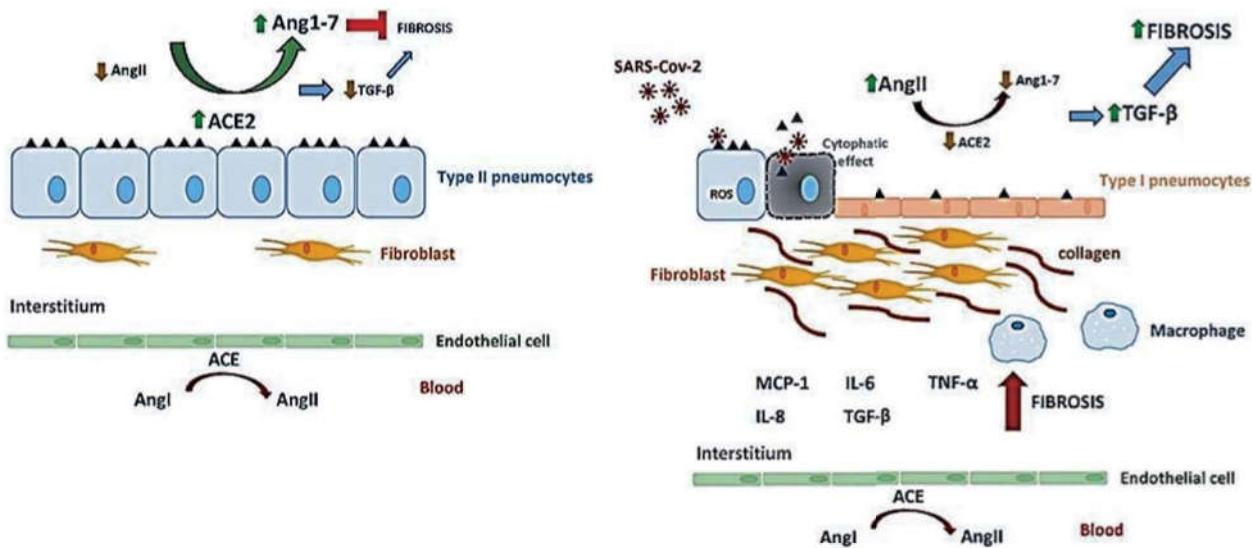


РИС. 12.

Ренин-ангiotензин система в гомеостазе (слева) и при инфекции SARS-CoV-2 (справа). Ангиотензин I (AngI), ангиотензин II (AngII), ангиотензин 1-7 (Ang1-7), ангиотензин превращающий фермент (ACE), ангиотензин превращающий фермент 2 (ACE2) [№8 - Delpino M.V., Quarleri J. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the Renin-Angiotensin System Favors Lung Fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 12 June 2020 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00340>]

восемь раз ниже у пациентов, получавших пероральную бактериотерапию. Как тяжесть заболевания так и смертность пациентов, переведенных в реанимацию, были выше среди пациентов, не получавших пероральную бактериотерапии. Авторы делают вывод о том, что специфическая бактериальная композиция продемонстрировала значительное улучшающее влияние на клинические показатели пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. Эти результаты также подчеркивают важность оси кишечник-легкие в контроле заболевания COVID-19 [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени, на фоне стремительного распространения SARS-CoV-2, выполнено и опубликовано огромное количество работ (около 40 тысяч публикаций с января по июль 2020 года), посвященных исследованиям динамики заражения, смертности и выздоровления, выявления ключевых отличий нового патогена от его предшественников, конкретным генам вируса, участвующим во взаимодействиях с продуктами генов хозяина, множественным метаболическим путем и физиологическим системам хозяина, изменяющимся под влиянием инфекции. В условиях высоких темпов распространения, краткости периода от инфицированности до летальных исходов, сложности в ряде случаев преодоления последствий заболевания, отсутствие надежных методов прогноза развития заболевания и его контроля, очевидна необходимость таких исследований. Однако их количество уже позволяет сделать определенные выводы. Изменение экспрессии отдельных генов и межбелковых взаимо-

действий не позволяет надежно прогнозировать повреждения эндотелия капилляров, эпителия альвеол, энтероцитов, геморрагий, формирования синдрома диссеминированной внутрикапиллярной коагуляции (DIC), угнетения различных звеньев иммунной системы. В основе каждого из этих явлений лежат взаимодействующие генные сети и динамика работы отдельных их звеньев по разному может влиять на конечный результат, что усложняет проблему использования терапии, направленной на отдельных генов.

Судя по накопленным данным, центральным событием является вмешательство вируса CoV-2 в эндотелий капиллярной системы с последующей гибелью эндотелиальных клеток и подавление функции адаптивного иммунитета. В этих процессах вирусная нагрузка и, связанные с ней, масштабы гибели эндотелиальных клеток, могут играть ключевую роль. По сути, синдром DIC является естественным ответом на повреждения целостности капиллярных стенок со всеми вытекающими последствиями. К сожалению, к настоящему времени недостаточно исследованными остаются вопросы влияния CoV-2 на гемопоэз в красном мозгу, что может вносить свой вклад в течение инфекционного процесса. Очевидно, что полиорганность действия CoV-2 определяется самой капиллярной системой, очередностью ее контакта (первая мишень, в основном – легкие), а также органной спецификой «густоты» капиллярной сети.

Изменения микробиоты инфицированных CoV-2 пациентов свидетельствуют о существенном влиянии вируса на взаимоотношения с бактериальными и вирусными факторами окружающей среды, что, в свою

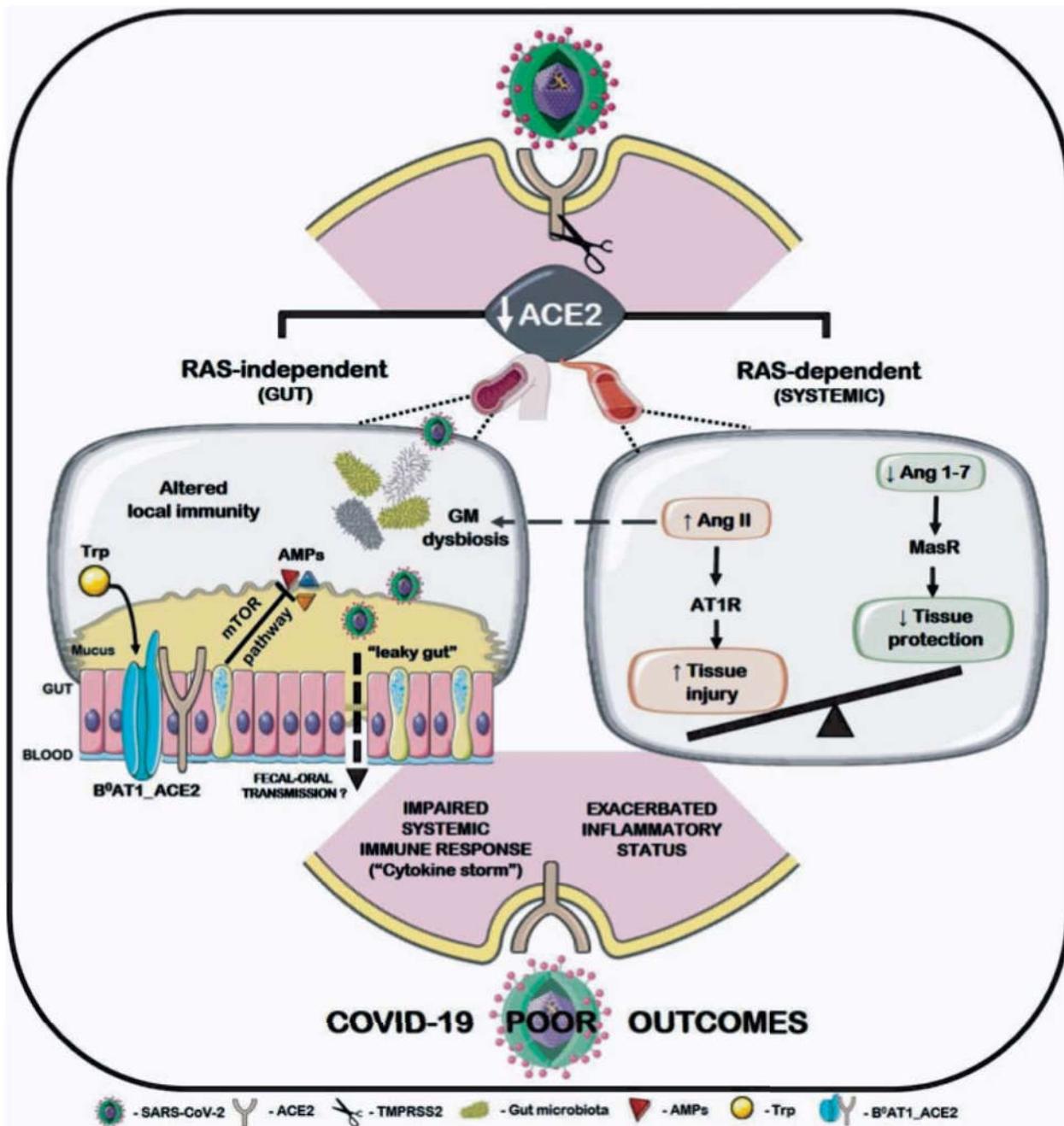


РИС. 13.

Предполагаемая ассоциация между разрушением ACE2 после инфекции SARS-CoV-2 и неблагоприятными исходами у пожилых пациентов COVID-19 с уже существующими возрастными сердечно-сосудистыми, кардиометаболическими и кардиоренальными заболеваниями. Несбалансированное соотношение Ang II / Ang 1-7, обусловленное потерей защитной функции ACE2, способствует передаче сигналов Ang II-AT1R и последующим сосудосуживающим, прогипертензивным, прооксидантным, провоспалительным и профиброзным событиям (RAS-зависимый путь, справа). Кроме того, выпадение ACE2, шаперона кишечного носителя B0AT1, может негативно повлиять на транспорт нейтральных аминокислот с последующим mTOR-зависимым усилением нарушенного синтеза, изменением местного иммунитета и дисбиозом кишечной микробиоты. Одновременно с этим повышенные уровни Ang II могут также ухудшать состав и функцию GM. Измененная проницаемость кишечного барьера может добавить дополнительный уровень сложности к этому сценарию, позволяя поступать компонентам местной микробиоты в кровоток, включая вирусные частицы SARS-CoV-2. Вопрос о том, способствуют ли эти события фекально-оральной передаче SARS-CoV-2, заслуживает дальнейшего изучения. Тем не менее, такие неблагоприятные cascades могут усугубить ранее существовавший дисбактериоз кишечника, системное воспаление и нарушение иммунного ответа у сердечно-сосудистых, кардиометаболических и кардиоренальных пациентов, что делает их менее защищенными при инфекции COVID-19 [№33 - Viana S.D., Nunes S., Reis F. ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities – Role of gut microbiota dysbiosis. Ageing Research Reviews, Volume 62, September 2020, 101123 Published online 2020 Jul 16. doi: 10.1016/j.arr.2020.101123]

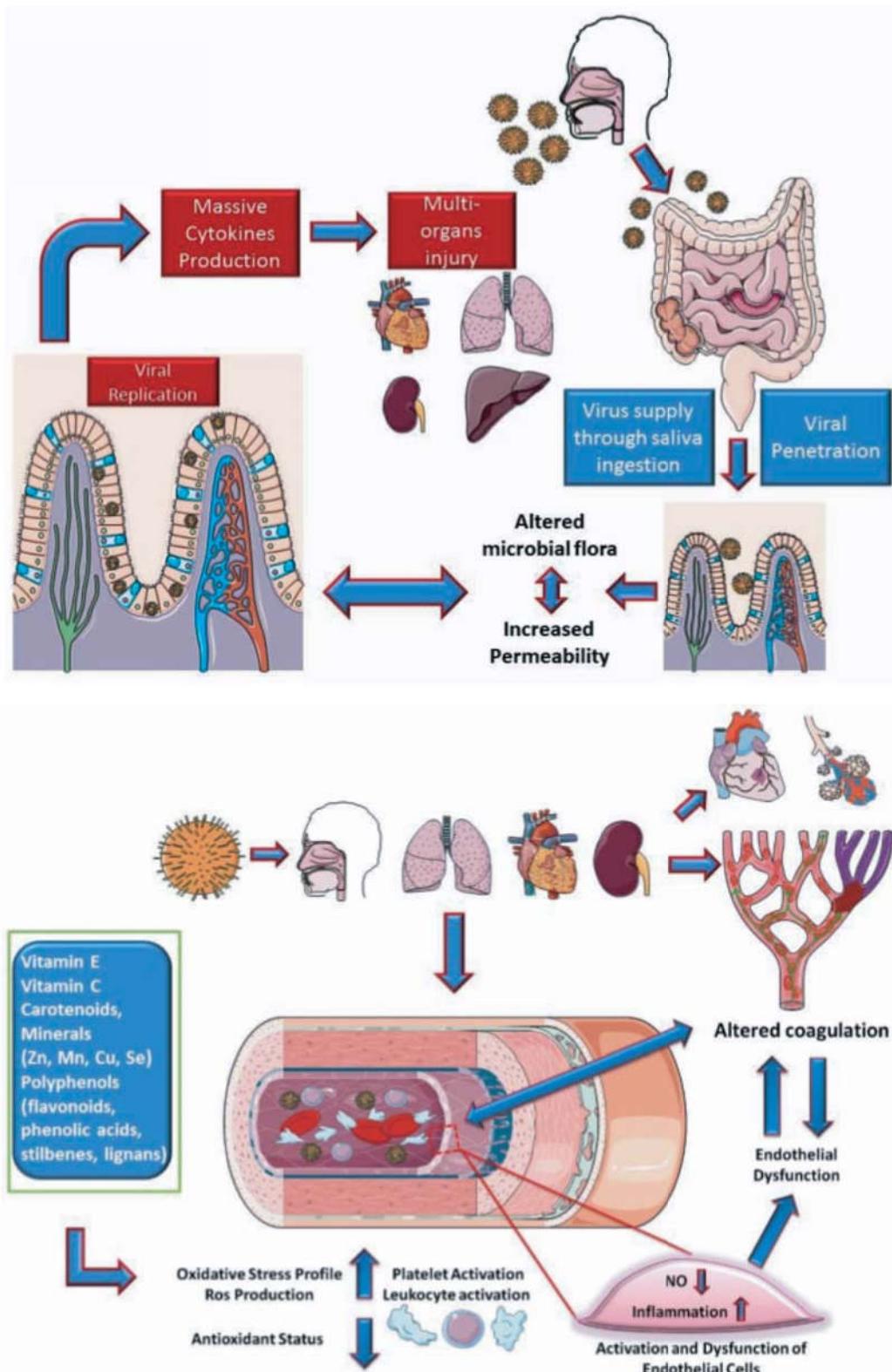


Рис. 14.

Гипотезы о механизмах вовлечения кишечника (справа) и эндотелия (слева) в COVID-19 [Infusino F, Marazzato M, Mancone M, Fedele F, Mastroianni CM, Severino P, Ceccarelli G, Santinelli L, Cavarretta E, Marullo AGM, Miraldi F, Carnevale R, Nocella C, Biondi-Zocca G, Pagnini C, Schiavon S, Pugliese F, Frati G, d'Ettorre G. Diet Supplementation, Probiotics, and Nutraceuticals in SARS-CoV-2 Infection: A Scoping Review. Nutrients. 2020 Jun 8;12(6):1718. doi: 10.3390/nu12061718]

очередь, может быть обусловлено и изменением функциональной активности иммунной системы. В этой связи определенные надежды представляют положительные результаты бактериальной терапии, полученные в ряде исследований, выполненных на пациентах, находящихся в реанимации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benger M., Williams O., Siddiqui J., Sztriha L. Intracerebral haemorrhage and COVID-19: Clinical characteristics from a case series [published online ahead of print, 2020 Jun 7]. *Brain Behav Immun.* 2020; 88:940-944. doi:10.1016/j.bbi.2020.06.005.
2. Cantuti-Castelvetri L., Ojha R., Pedro L.D., Djannatian M., Franz J. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and provides a possible pathway into the central nervous system. *bioRxiv* 2020.06.07.137802; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.07.137802>.
3. CAO, W., LI, T. COVID-19: towards understanding of pathogenesis. *Cell Res* 30, 367–369 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0327-4>.
4. CHANNAPPANAVAR R., FETT,C., MACK M., TENEYCK P.P., MEYERHOLZ D.K., PERLMAN S. Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J.Immunol.* 2017; 198,4046–4053 DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601896>.
5. CHEN W. A potential treatment of COVID-19 with TGF- β blockade. *Int J Biol Sci* 2020; 16(11):1954-1955. doi:10.7150/ijbs.46891.
6. CHOI G., NA H., KUEN D.S., KIM B.S., CHUNG Y. Autocrine TGF- β 1 Maintains the Stability of Foxp3+ Regulatory T Cells via IL-12R β 2 Downregulation. *Biomolecules.* 2020;10(6):819. doi:10.3390/biom10060819.
7. DANILOSKI Z., GUO X., SANJANA N.E. The D614G mutation in SARS-CoV-2 Spike increases transduction of multiple human cell types. Version 2. *bioRxiv*. 2020 Jun 15:2020.06.14.151357. doi: 10.1101/2020.06.14.151357.
8. DELPINO M.V., QUARLERI J. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the Renin-Angiotensin System Favors Lung Fibrosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 12 June 2020 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00340>)
9. D'ETTORRE G., CECCARELLI G., MARAZZATO M., CAMPAGNA G., PINACCHIO C., et al. Challenges in the Management of SARS-CoV2 Infection: The Role of Oral Bacteriotherapy as Complementary Therapeutic Strategy to Avoid the Progression of COVID-19. *Front Med (Lausanne)*. 2020; 7: 389. Published online 2020 Jul 7. doi: 10.3389/fmed.2020.00389.
10. GEMMATI D., BRAMANTI B., SERINO M.L., SECCHIERO P., ZAULI G., TISATO V. COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males? *Int J Mol Sci.* 2020 May 14;21(10):3474. doi: 10.3390/ijms21103474.
11. GORDON D.E., JANG G.M., BOUHADDOU M., et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020;583(7816):459-468. doi:10.1038/s41586-020-2286-9.
12. GOSHUA G., PINE A.B., MEIZLISH M.L., et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* 2020;7(8):e575-e582. doi:10.1016/S2352-3026(20)30216-7.
13. GROBLER C., MAPHUMULO S.C., GROBBELAAR L.M., et al. Covid-19: The Rollercoaster of Fibrin(Ogen), D-Dimer, Von Willebrand Factor, P-Selectin and Their Interactions with Endothelial Cells, Platelets and Erythrocytes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):E5168. Published 2020 Jul 21. doi:10.3390/ijms21145168.
14. GU S., CHEN Y., WU Z., CHEN Y., GAO H., et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa709. doi: 10.1093/cid/ciaa709.
15. INFUSINO F., MARAZZATO M., MANCONE M., FEDDELE F., MASTROIANNI C.M., et al. Diet Supplementation, Probiotics, and Nutraceuticals in SARS-CoV-2 Infection: A Scoping Review. *Nutrients.* 2020 Jun 8;12(6):1718. doi: 10.3390/nu12061718.
16. IWANAGA N., COOPER L., RONG L., BEDDINGFIELD B., CRABTREE J., et al. Novel ACE2-IgG1 fusions with improved activity against SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020 Jun 15:2020.06.15.152157. doi: 10.1101/2020.06.15.152157. Preprint.
17. KIM C-H. SARS-CoV-2 Evolutionary Adaptation toward Host Entry and Recognition of Receptor O-Acetyl Sialylation in Virus-Host Interaction. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun; 21(12): 4549. doi:10.3390/ijms21124549.
18. KORBER B., FISCHER W.M., GNANAKARAN S., YOON H., THEILER J., et al. Sheffield COVID-19 Genomics Group, McDanal C, Perez LG, Tang H, Moon-Walker A, Whelan SP, LaBranche CC, Saphire EO, Montefiori DC. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus Cell. 2020 Jul 3:S0092-8674(20)30820-5. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
19. LI X., GENG M., PENG Y., MENG L., LU S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharmaceutical Analysis*, V.10, Is.2, 2020, P. 102-108 <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.
20. LU R., ZHAO X., LI J., NIU P., YANG B., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

21. MALIK Y. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. Malaysian J Pathol 2020; 42(1) : 3 – 11.
22. MALKIN C.J., PUGH P.J., JONES R.D., KAPOOR D., CHANNER K.S., JONES T.H. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. J.Clin. Endocrinol. Metab. 2004, 89, 3313–3318. doi: 10.1210/jc.2003-031069.
23. MATHESON N.J., LEHNER P.J. How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? Science. 2020 Jul 31; 369(-6503):510-511. doi: 10.1126/science.abc6156. PMID: 32732413.
24. NI W., YANG X., YANG D., BAO J., LI R., ET AL. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. Version 2. Crit Care. 2020 Jul 13;24(1):422. doi: 10.1186/s13054-020-03120-0.
25. OHIRA K., NAKAHARA A., KONNAI S., OKAGAWA T., NISHIMORI A., ET AL. Bovine leukemia virus reduces anti-viral cytokine activities and NK cytotoxicity by inducing TGF-β secretion from regulatory T cells. Immun Inflamm Dis. 2016 Jan 18;4(1):52-63. doi: 10.1002/iid.393.
26. OU X., LIU Y., LEI X., LI P., MI D., Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. Nat Commun 11, 1620 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
27. PERETZ J., PEKOSZ A., LANE A.P., KLEIN S.L. Estrogenic compounds reduce influenza A virus replication in primary human nasal epithelial cells derived from female, but not male, donors. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2016, 310, L415–L425. doi:10.1152/ajplung.00398.2015.
28. PILLAY T.S. Gene of the month: the 2019- nCoV/ SARS- CoV-2 novel coronavirus spike protein. J Clin Pathol 2020;73:366–369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658.
29. RETTEW J.A., HUET-HUDSON Y.M., MARRIOTT I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. Biol. Reprod. 2008, 78, 432–437. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>;
30. STRAUB R.H. The complex role of estrogens in inflammation. Endocr. Rev. 2007, 28, 521–574. doi: 10.1210/er.2007-0001.
31. TEUWEN L., GELDHOF V., PASUT A., CARMELIET P. COVID-19: the vasculature unleashed. Nat Rev Immuno 2020, 389–391 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0343-0>.
32. TROTTEIN F., HARRY SOKOL H. Potential Causes and Consequences of Gastrointestinal Disorders during a SARS-CoV-2 Infection. Cell Rep. 2020 Jul 21; 32(3): 107915. Published online 2020 Jul 3. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107915.
33. VIANA S.D., NUNES S., REIS F. ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities – Role of gut microbiota dysbiosis. Ageing Research Reviews, Volume 62, September 2020, 101123 Published online 2020 Jul 16. doi: 10.1016/j.arr.2020.101123.
34. WANG F., HOU H., LUO Y., TANG G., WU S., ET AL. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. JCI Insight. 2020 May 21;5(10):e137799. doi: 10.1172/jci.insight.137799.
35. WEI L.L., WANG W.J., CHEN D.X., XU B. Dysregulation of the immune response affects the outcome of critical COVID-19 patients [published online ahead of print, 2020 Jun 16]. J Med Virol. 2020;10.1002/jmv.26181. doi:10.1002/jmv.26181.
36. WOO P.C., LAU S.K., LAM C.S., LAU C.C., TSANG A.K., ET AL. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. J Virol. 2012;86(7):3995-4008. doi:10.1128/JVI.06540-11
37. XU B., FAN C.Y., WANG A.L., ZOU Y.L., YU Y.H., ET AL. Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: A clinical retrospective study in Wuhan, China. J Infect. 2020 Jul;81(1):e51-e60. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.012.
38. ZHANG H., AI J.W., YANG W., ZHOU X., HE F., ET AL. Metatranscriptomic Characterization of COVID-19 Identified A Host Transcriptional Classifier Associated With Immune Signaling [published online ahead of print, 2020 May 28]. Clin Infect Dis. 2020;ciaa663. doi:10.1093/cid/ciaa663.
39. ZHANG L., JACKSON C.B., MOU H., OJHA A., RANGARAJAN E.S., ET AL. The D614G mutation in the SARS-CoV-2 spike protein reduces S1 shedding and increases infectivity. bioRxiv. 2020 Jun 12:2020.06.12.148726. Preprint.

Глазко Галина Валерьевна,
 к.б.н., профессор факультета биомедицинской информатики Университета медицинских наук штата Арканзас,

❷ Литл-Рок, 72205, Арканзас, США
 Little Rock, 72205 AR, USA

Косовский Глеб Юрьевич,
 д.б.н., профессор РАН, директор ФГБНУ Научно-исследовательского института пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (НИИ ПЗК имени В.А. Афанасьева),

❷ Московская обл., Раменский район, пос. Родники, ул. Трудовая-6, e-mail: gkosovsky@mail.ru
 Moskovskaya obl., Ramenskiy rayon, pos. Rodniki, st. Trudovaya-6

Зыбайлов Борис Леонтьевич,
 к.б.н., профессор факультета биохимии и молекулярной биологии Университета медицинских наук штата Арканзас,

❷ Литл-Рок, 72205, Арканзас, США
 Little Rock, 72205, AR, USA

Глазко Валерий Иванович,
 д.с.-х.н., профессор, академик РАН (иностранный член), профессор факультета зоотехнии и биологии Российского государственного аграрного университета – Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева); главный научный сотрудник ФГБНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (НИИ ПЗК имени В.А. Афанасьева),

❷ 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
 127550, Moscow, st. Timiryazevskaya, 49,
 тел.: +7 (916) 145-38-60, e-mail: vigvalery@gmail.com;

Глазко Татьяна Теодоровна,
 д.с.-х.н., профессор факультета зоотехнии и биологии Российского государственного аграрного университета – Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева); главный научный сотрудник ФГБНУ НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (НИИ ПЗК имени В.А. Афанасьева),

❷ 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
 127550, Moscow, st. Timiryazevskaya, 49,
 тел.: +7 (915) 301-89-60, e-mail: tglazko@rambler.ru