

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА Nrf2 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЛАВОНОИДОВ КАК ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ ПРЕДУПРЕДИТЬ И МОДУЛИРОВАТЬ ТЯЖЕСТЬ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2

(Переведено по изданию: P.Mendonca, K.F.A.Soliman. Flavonoids activation of the transcription factor Nrf2 as a hypothesis approach for the prevention and modulation of SARS-CoV-2 infection severity. – Antioxidants 2020, 9, 659; doi:10.3390/antiox9080659)

Краткое содержание: Проводящий путь Nrf-Keap1-ARE – это основной регулятор генов антиоксидантов и генов детоксикации фазы II. Активация этого пути усиливает экспрессию антиоксидантных и цитопротективных белков, защищающих клетки против инфекции. Фактор Nrf2 модулирует вызванный вирусом окислительный стресс, возникновение ROS и патогенез заболевания, существенные с точки зрения жизненного цикла вируса. При респираторных вирусных инфекциях, таких как вызванный коронавирусом 2 (SARS-CoV-2) тяжёлый острый респираторный синдром, воспалительный процесс и окислительный стресс в выстилающих эпителиальных клетках активируют транскрипцию фактора Nrf2, что защищает клетки от окислительного стресса и воспаления. При этом Nrf2 снижает экспрессию рецепторов ангиотензин-конвертирующего гормона 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) в респираторных эпителиальных клетках. Вирус SARS-CoV-2 обладает высоким сродством к рецептору ACE2, который работает как рецептор коронавирусного поверхностного гликопротеина вирусных шипиков (spike glycoprotein), способствуя вхождению (проникновению) вируса в клетку. Тяжесть болезни может быть обусловлена также предшествующими условиями, например, повреждением иммунного ответа, ожирением и возрастом больных – состояниями, общим признаком которых бывает пониженный уровень Nrf2. Следовательно, активаторы Nrf2 могут повысить уровень Nrf2 и усилить экспрессию антивирусных медиаторов, способных инициировать «противовирусное состояние», праймируя клетки против вирусной инфекции. Таким образом, в этой статье описана гипотеза, касающаяся использования флавоноидных добавок в сочетании с витамином D3 для активации Nrf2, которые могут стать возможной мишенью для предотвращения и/или снижения тяжести инфекции SARS-CoV-2 путём снижения окислительного стресса и воспаления при усилении врождённого иммунитета и регуляторного снижения количества рецепторов ACE.

Ключевые слова: рецепторы ACE2; COVID-19; эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG, epigallocatechin-3-gallate), флавоноиды, Nrf2; SARS-CoV-2, тимохинон (thymochinone); витамин D3.

1. Вступление

О новом коронавирусном инфекционном заболевании (COVID-19), вызванном коронавирусом тяжёлого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), сообщено впервые в декабре 2019 г. в Ухане (Wuhan, Китай), и с тех пор это заболевание вызвало огромную пандемию [1, 2]. На 20-е июля 2020 г. всего в мире было инфицировано 14.774.887 чел. и умерло 611.599 чел. (4,1%) Только в США заболело 3.858.686 и умерло 141.426 чел. Возбудитель SARS-CoV-2 – это один из семи коронавирусов, вызывающих респираторные недуги человека. Известно, что четыре из них вызывают общие симптомы простудного заболевания, а два других – тяжёлый острый респираторный синдром (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) и средневосточный респираторный синдром (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-

CoV), вызвавший тысячи смертей от респираторного заболевания [3, 4]. Всё ещё не найдено специфического лечения при инфекции COVID-19 вопреки применению многих терапевтических подходов, включая противовирусные соединения, кортикостероиды, лекарства, используемые для лечения малярии и аутоиммунных недугов; использовались также антитела от лиц, выздоровевших после заражения COVID-19, и механические устройства для облегчения дыхания [5-7]. По данным Центров по контролю заболеваемости (Centers of Disease Control and Prevention, CDC), в группы риска входят лица преклонного возраста и люди всех возрастов с такими недугами, как диабет, ожирение, хронические заболевания печени и почек, гипертензия, легочные недуги, астма и какие-либо заболевания, способные вызвать угнетение иммунной системы. Так как на тяжесть заболевания могут влиять многие факторы, важно обратить внимание на пути предупреждения и лечения инфекции SARS-CoV-2 [8]. Важно распознавать людей из группы риска, используя для терапевтического вмешательства все новые молекулярные мишени и проводящие пути. Здесь, высказывая нашу гипотезу, мы описываем использование флавоноидных добавок для активации транскрипционного фактора Nrf2, который может стать новой мишенью для предупреждения инфекции SARS-CoV-2, снижая окислительный стресс и воспаление, усиливая врожденный иммунитет и регуляторно понижая рецепторы ангиотензин-превращающего фермента ACE2. Антиоксидантные свойства

2. Патогенез COVID 19

Симптомы у лиц, заразившихся SARSCoV-2, многочисленны и варьируют по своей тяжести, включая сухой кашель, боль в горле, миалгию, усталость, диарею и затруднённое дыхание [1, 9, 10]. У больных с тяжёлым нарастанием заболевания наблюдали в течение нескольких дней острое поражение легких (acute lung injury, ALI), дыхательную недостаточность, сердечную недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром (acute respiratory distress syndrome, ARDS), сепсис и неожиданную остановку сердца [1, 11]. При COVID-19 с мягким поражением лёгких обнаруживаются отёк, белок-содержащий экссудат с воспалительной пятнистой глобулярной инфильтрацией клеток и умеренное образование гиалиновых мембран [12]. У больных с тяжёлыми признаками ARDS посмертный анализ обнаруживает двустороннее диффузное поражение альвеол с отёком, шелушение (отслаивание) пневмоцитов и образование гиалиновой мембраны [13], что напоминает патологические особенности пневмоний, наблюдаемых при инфекциях SARS и MERS [14].

При инфекции SARS-CoV-2 воспалительный процесс активируется, сопровождаясь выработкой провоспалительных цитокинов и гибелью клеток эпителия и эндотелия, приводя к вытеканию жидкости из сосудов, появлению аномальных Т-клеток и макрофагов, что стимулирует ALI/ARDS или даже вызывает смерть [15]. При заражении COVID-19 появляется лимфопения и пневмония, а в тяжёлых случаях усиливается выражение провоспалительных цитокинов IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A и TNF α [1]. Клинические данные указывают, что сильное противовоспалительное состояние может иметь жизненное значение с точки зрения нарастания и тяжести недуга. Повышенные уровни цитокинов могут вызвать сепсис и повреждение лёгких из-за того, что воспалительный процесс приводит ко многим осложнениям, как, например, ARDS, пневмония, дыхательная недостаточность, шок, недостаточность органов, и, наконец, смерть [16]. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов наблюдали также в сыворотках больных при SARS-CoV и MERS-CoV, что свидетельствует о сходном механизме тяжести заболевания, которая проявляется при цитокиновом шторме [17,18].

Врожденный иммунный ответ организма при вирусной инфекции зависит от интерферона типа I, активирующего регуляторное понижение каскада реакций, контролирующего размножение вируса и усиливающих удачный адаптивный иммунный ответ. Оказавшись в дыхательных путях человека, SARS-CoV-2 присоединяется к альвеолярному эпителию и активирует иммунную систему [19]. У здоровых людей вирусная инфекция инициирует воспалительный

процесс и рекрутирует иммунные клетки для удаления патогена, и больной может выздороветь. Однако у людей преклонного возраста и лиц со слабым здоровьем неконтролируемый иммунный ответ может привести к сверхпродукции цитокинов и тяжёлому воспалению с усилением проницаемости капилляров и большому количеству клеток крови в альвеолах, что приводит к пневмонии, одышке, воспалению дыхательных путей, задышке и даже дыхательной недостаточности, которая вызывает смерть [16].

3. Ядерный фактор, родственник эритроидному фактору 2

(Nrf2)

Транскрипционный ядерный фактор Nrf2, родственник эритроидному фактору 2 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor¹), кодируется геном *NFE2L2* и регулирует деятельность примерно 250 генов, участвующих в клеточном гомеостазе, включая антиоксидантные белки, детоксикационные ферменты, переносчики лекарств и многочисленные цитопротективные белки [20]. При этом Nrf2 нацеливается на гены, связанные с защитой клетки, в которой участвуют элементы антиоксидантного ответа (anti-oxidant response elements, ARE), включающие антиоксидантные белки (например, глутаматцистеинлигазы, glutamate cysteine lygase, GCLs), ферменты, метаболизирующие лекарственные вещества, например цитохромы P450, глутатион-S-трансферазы (glutathione S-transferases, GSTs), молекулярные шапероны, ДНК-восстанавливающие (ДНК-репарирующие) ферменты и субъединицы протеасом [21]. Транскрипция генов, опосредуемая Nrf2, зависит от образования гетеродимеров Nrf2 с малыми Maf-белками (Maf proteins – MafG, MafK, MafF), нужными для надёжного связывания с ARE/EpRE [элемент антиоксидантного ответа/электрофильный элемент ответа, antioxidant response element/electrophilic response element] [22]. Транскрипция этих защитных генов даёт клетке возможность поддерживать редокс-баланс и удалять белки, повреждённые в условиях окислительного и ксенобиотического стресса (oxidative and xenobiotic stress) [23].

В нормальных условиях Nrf2 в цитоплазме связан с негативным регуляторным белком; это Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 [(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)], который взаимодействует с Nrf2 и работает как адапторный белок, поддерживая низкие уровни Nrf2 [24-26] и обеспечивая постоянный его распад через протеасому при процессе, опосредуемом убиквитином (ubiquitin) [27, 28]. При вирусной инфекции Keap1 защищает окислительный стресс путём конъюгации редокс-чувствительных цистеиновых остатков (redox-sensitive cysteine residues) Cys151, Cys273 и Cys288, и Nrf2 высвобождается из репрессированного состояния при посредстве Keap1 [29,30]. Его выход из Keap 1 мешает убиквитинизации Nrf2, а период его полужизни возрастает с 15 до 180 мин [31-33]. После транслокации Nrf2 в ядро образуется комплекс его с коактиваторами и присоединение к промоторным участкам (AREs). Такое связывание вызывает транскрипцию цитопротективных и детоксикационных генов [34-37]. Более того, активация Nrf2 усиливает активность врождённой иммунной системы, ослабляя или удаляя многочисленные бактериальные и вирусные патогены [38] (рис. 1).

Во многих исследованиях описано, что избыточное повреждение клеточных макромолекул многочисленными факторами может вызвать образование петли прямой связи (feed-forward regulatory loop), которая способна вызвать смерть клетки [39-40]. Ответ антиоксидантной системы, опосредуемый Nrf2, связан с ее внутриклеточным регулированием, и при низких дозах активаторов Nrf2 большинство эффекторов проводящего пути Nrf2/ARE обеспечивают защиту клетки [41]. Цукер с сотрудниками (Zucker et al., 2014) полагают, что регуляторный механизм ROS осуществляется через прямую связь, опосредуемую Nrf2. При низком уровне окислительного стресса Nrf2-зависимые антиоксидантные гены активируются, снижая ROS до уровней, не мешающих выживанию клетки. Однако при избыточном уровне ROS постоянная

¹ Не нашла лучшего официального перевода на русский (точнее, не нашла никакого); но смысл таков.

активация Nrf2 вызывает накопление его в ядре с последующим его присоединением к промотору Круппель-подобного фактора 9 [Kruppel-like factor 9 (Klf9)]. Регуляторное повышение транскрипции Klf9, нового регулятора внутриклеточного ROS, может тогда привести к повышению уровня ROS и к последующей смерти клетки [41, 42]. Таким образом, согласно этим исследованиям, избыточный уровень оксидативного стресса требуется, чтобы активировать транскрипцию Klf9, что вряд ли бывает при вирусной инфекции, так как для вируса требуется оптимальный уровень оксидативного стресса, чтобы поддерживать вирусный метаболизм, не вызывая гибели хозяина [43].

4. Активация Nrf2 и инфекция COVID-19

За последние десятилетия опубликовано много сведений, касающихся роли Nrf2 в воспалении, иммунитете, окислительно-восстановительном гомеостазе, старении, нейродегенерации и многих других процессах, но немного известно о роли этого фактора при вирусных инфекциях. Недавно исследование, проведенное на 40 больных, показало, что тяжесть поражения при инфекции COVID-19 прямо связана с возрастом и интенсивностью воспалительного ответа и обратимо зависит от выражения Nrf2 [44, 45]. МакКорд с сотрудниками (McCord et al., 2020) предположили, что у молодых здоровых людей происходит сильная активация Nrf2, вызванная окислительным стрессом; она спасает клетки хозяина от необратимого «самообусловленного (самовызванного) повреждения» (self-inflicted damage). У лиц преклонного возраста или же у людей с сопутствующими недугами, которые сопровождаются хроническими воспалениями, ответа на инфекцию с активацией Nrf2 может быть недостаточно, чтобы прервать сплошной ход событий. Индукция активации Nrf2 может способствовать прекращению продукции цитокинов у этих лиц; тогда начнется выздоровление и восстановление после воспалительного процесса [46]. При фармакологической активации Nrf2 смогли вызвать модуляцию 42-х генов, связанных с инфекционностью респираторного вируса и с устойчивостью, и привести к ассоциированному иммунному ответу. По-видимому, активация Nrf2 приводит к многочисленным антивирусным воздействиям, что может вносить вклад в устойчивость к вирусу, снижая скорость его размножения, смягчая симптомы и давая возможность успешно пережить цитокиновый шторм; это особая проблема в случае с COVID-19 [46].

Изучение биоптатов лёгких от больных COVID-19 показало угнетение проводящего пути Nrf2; но, с другой стороны, соединения-индукторы Nrf2 ингибируют размножение SARS-CoV2 и снижают уровень воспалительного ответа [47]. Хотя при респираторных вирусных инфекциях в заражённых клетках наблюдают окислительно-восстановительный гомеостаз, а также воспалительные процессы в лёгких, сведения, полученные о вирусах, поражающих дыхательные пути, можно экстраполировать на недавние исследования COVID-19, когда появляется больше экспериментальных доказательств [48, 49]. Активаторы Nrf2, такие как диметилфумарат (dimethyl fumarate) и 4-октилитаконат (4-octyl itaconate) [50], угнетают воспалительный ответ на SARS-CoV2 в клетках человека, включая и мононуклеары периферической крови, полученные от больных с инфекцией COVID-19 [47]. Фактор Nrf2 производит всесторонний контроль за воспалительным ответом и необходим для его осуществления и установления. Более того, контролируя эндогенные системы защиты клеток, Nrf2 может играть более физиологическую функцию, направленную на достижение равновесия между благотворными и разрушительными воздействиями воспаления [40].

5. Вирусная инфекция и окислительный стресс

В многочисленных публикациях описана роль вирусов в возникновении окислительного стресса, способствующего размножению вируса в клетке. Вызванный инфекцией окислительный стресс, обусловленный вирусом, активирует жизненно важную противовирусную сигнализацию, включая также и toll-подобные рецепторы (toll-like receptors), и синтез интерферона [51]. Во время инфекции вирус нуждается для размножения в том, чтобы

экспрессировать несколько белков внутри клетки-хозяина. Эти белки отвечают за индукцию оксидативного стресса, который не только важен для прохождения цикла развития вируса и сборку новых вирионов, но и обуславливает патогенез вируса [52]. Однако высокий уровень оксидативного стресса может привести также и к гибели клетки-хозяина. Поэтому вирус нуждается в том, чтобы поддерживать оптимальные уровни окислительного стресса, чтобы поддержать собственный метаболизм, но не слишком высокий уровень, чтобы не угробить клетку-хозяина [43].

Поддержка соответствующего уровня окислительно-восстановительного потенциала клеткой-хозяином может вносить свой вклад в патогенез, вызывая массовую смерть клеток из-за мощного окислительного стресса [53, 54]. По-видимому, такое отсутствие равновесия между продукцией ROS и системой антиоксидантной защиты находится в прямой связи с нарушением общей физиологии клетки [52]. Поэтому возрастающее количество публикаций показывает, что этот индуцированный вирусом окислительный стресс представляет собой один из наиболее важных патогенетических механизмов для воспалительного ответа и поражения тканей, вызванного вирусной инфекцией [55, 56].

Чтобы нейтрализовать вредное воздействие оксидативного стресса, клетки млекопитающих имеют уникальную антиоксидантную систему защиты; предполагается, что она способна вернуть клетку к нормальным физиологическим условиям. В противном случае, сталкиваясь с оксидативным стрессом, Nrf2, являясь молекулой, чувствительной к окислителям (oxidant-sensitive molecule), активируется и стимулирует транскрипцию ряда генов, отвечающих за цитопротекцию и за детоксикацию. Это один из наиболее полно охарактеризованных факторов, вызывающих транскрипцию антиоксидантных генов, фактор с сенсорной функцией (oxidants/electrophile-sensor function) [57].

6. Активация Nrf2 регуляторно снижает экспрессию рецептора ACE2

Генетически последовательность SARS-CoV-2 на 70% или более сходна с последовательностью SARS-CoV, и обе они обладают высоким сродством к одному и тому же рецептору, расположенному на респираторных эпителиальных клетках – рецептору ангиотензин-превращающего фермента (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). ACE2 – это основной рецептор для гликопротеина поверхностных шипиков вируса (surface spike glycoprotein, S) [19, 58]. Коронавирусный S-белок связывается с рецепторами хозяина и облегчает вход вируса в клетку-мишень. Через N-концевой домен и C-концевой домен RBD S-белок прямо взаимодействует с рецепторами хозяина [59]. Таким путем белок SARS-S связывается с рецептором ACE2 и использует серин 2 трансмембранной сериновой протеазы (trans-membrane protease serine 2, TMPRSS2) для праймирования S-белка [60]. Хотя и SARS-CoV, и SARS-CoV-2 присоединяются к одному и тому же рецептору ACE2, степень афинности в случае SARS-CoV-2 примерно в 10-20 раз выше, чем в случае SARS-CoV, что увеличивает вероятность распространения недуга от одного человека к другому [61] (рис. 2).

Недавние исследования показали, что активация фактора Nrf2 регуляторно снижает экспрессию ACE2, а его недостаточность ее регуляторно повышает [62]. Исследования, проводимые на мышах с выключением Nrf2 (Nrf2 knockout mice), показывают, что у животных с отсутствием этого фактора усиливается экспрессия ACE2. В культивируемых перевиваемых проксимальных клетках почечных канальцев (renal proximal tubule cells) трансфекция с введением малых интерферирующих РНК Nrf2 или ингибитора Nrf2 тригонеллина (trigonelline) препятствует стимуляции переноса Nrf2 в ядро под действием глюкозы и увеличивает транскрипцию ACE2 [62]. Хотя пока не понят точный механизм, по которому недостаточность Nrf2 приводит к повышению экспрессии гена ACE2, полученные данные свидетельствуют о возможной роли Nrf2 в модуляции рецепторов ACE2 и в инфекции SARS-CoV-2 (рис. 2).

7. Гипометилирование, опосредованное окислительным стрессом, повышает экспрессию рецепторов ACE2

ACE2 – это функциональный рецептор, позволяющий SARS-CoV-2 входить в клетку. При инфекции SARS-CoV-2 повышения экспрессия ACE2 может вызвать вирусемию и повреждение органов. При инфекции SARS-CoV-2 вирусные частицы, которые тоже присоединяются к рецепторам ACE2, заражают клетки иммунной системы, например, Т-клетки периферической крови, что ведет к распространению вируса [63]. Ген ACE2 расположен на X-хромосоме, и данные полногеномного анализа метилирования ДНК показывают существенное снижение метилирования в гене ACE2 в группе деметилированных Т-клеток [64, 65]. Гипометилирование касается сайтов CpG в участке ACE2-промотора, расположенного проксимально к точке начала транскрипции, 5'-нетранслируемому участку и 3'-нетранслируемому участку, что указывает на регуляторное воздействие изменений метилирования [66]. Полученные данные показывают, что выражение ACE2 регулируется метилированием ДНК и что при волчанке (lupus disease) недостаточность метилирования может привести к сверхэкспрессии ACE2 [66].

Кроме того, более очевидную недостаточность метилирования ДНК наблюдали при усилении волчанки, которая может осложняться и при повышении уровней окислительного стресса, и при вирусной инфекции [67]. Показано, что окислительный стресс затормаживает метилирование ДНК, приводя к ослаблению сигнального пути MEK/ERK и к снижению экспрессии ДНК-метилтрансферазы (DNA methyltransferase, DNMT1) [67, 68]. В придачу, окислительный стресс приводит к активации mTOR и усилению недостаточности метилирования ДНК при ингибировании DNMT1 из-за истощения NADPH и снижения уровней глутатиона [69]. Таким образом, полученные данные показывают, что окислительный стресс при заражении SARS-CoV-2 способен усилить недостаточность метилирования ДНК у больных волчанкой и ускорить входение вируса в клетку из-за усиленной экспрессии ACE2 [66].

При инфекции SARS-CoV-2 входение вируса в клетки хозяина может привести к повреждению тканей и к окислительному стрессу, ухудшая воспалительный процесс и приводя к цитокиновому шторму [66]. При этом тяжесть инфекции SARS-CoV-2 может отягощаться эпигенетической дисрегуляцией, а распространение болезни может усиливаться из-за повышенной экспрессии рецепторов ACE2 в мононуклеарах периферической крови [66]. Исследование показывает, что больные волчанкой более чувствительны к инфекции SARS-CoV-2 и к её осложнениям [66]. Следовательно, окислительный стресс играет роль в экспрессии рецепторов ACE2 и может заострять тяжесть инфекции SARS-CoV-2 .

8. Регуляторное понижение Nrf2, окислительный стресс и экспрессия протеаз

При вирусных инфекциях человека, включая SARS-CoV и грипп, происходит регулярный протеолиз, необходимый для распространения вируса (viral spread/propagation). В лёгком экспрессия протеаз – TMPRSS2, трипсиноподобной протеазы дыхательных путей человека HAT {human airway trypsin-like protease, HAT) и ингибитора секреторной протеазы лейкоцитов (secretory leukocyte proteinase inhibitor, SLPI) – необходима для того, чтобы раскалывать белок поверхностного вирусного гемагглютинина и обеспечить слияние клетки с вирусом и его входение в клетку [70-74]. Интересно, что в геноме SARS-CoV-2 нет гена гемагглютинин-эстеразы (hemagglutinin-esterase), типичного для бета-коронавирусов [75]. Исследования показывают, что взаимосвязь между окислительным стрессом и воспалительными процессами может вызвать изменения в экспрессии этих протеаз/антипротеаз [76, 77]. При гриппозной инфекции ускоренное входение вируса и его последующая репликация связаны со снижением экспрессии/активности Nrf2 и опосредуются активацией транс-мембранных протеаз в хозяйской клетке [78]. У астматиков HAT при воспалении высвобождается в жидкость в дыхательных путях [76, 77], и показано, что экспрессия гена SLPI увеличивается у Nrf2-дефицитных мышей, усиливая воспаления и проявляя равновесие между окислительным стрессом и экспрессией протеаз [79]. Кесик с сотрудниками (Kesik et al., 2011) показали, что снижение экспрессии гена

Nrf2 вызывает оксидативный стресс и стимулирует активность сериновой протеазы, приводя к раскалыванию гемагглютинаина и, значит, к ускоренному проникновению вируса в клетку [78]. Показано, что активация экспрессии гена *Nrf2* может защитить клетки от инфекции, прекращая вхождение вируса в клетку и его размножение. Усиленная экспрессия *Nrf2* может уменьшить оксидативный стресс и, следовательно, снизить активность сериновой протеазы. Согласно этим данным, выходит, что транскрипция фактора *Nrf2* может играть ключевую роль в чувствительности к вирусной инфекции на уровне эпителия [78].

9. Активация *Nrf2* влияет на тяжесть вирусной инфекции

Механизмы вирусной инфекции очень сложны, и всё ещё необходимо изучать факторы, могущие повлиять на чувствительность к вирусным респираторным инфекциям. Предсуществующие заболевания, повреждение иммунного ответа, ожирение и возраст, среди прочих других факторов, могут влиять на тяжесть заболевания [22, 80, 81]. Репликация вирусного генома и сборка новых вирионов поддерживаются экспрессией многих белков в клетке хозяина, и многие из них отвечают за возникновение реактивных видов кислорода (reactive oxygen species, ROS) [82, 83]. Вызванный вирусом окислительный стресс, возникновение ROS и патогенез заболевания играют жизненно важную роль в жизненном цикле вируса, усиливая активацию антиоксидантных защитных механизмов клетки-хозяина. Окислительный стресс вызван нарушением равновесия между продукцией ROS и способностью организма успешно обезвреживать активные промежуточные соединения. С этой точки зрения, *Nrf2* играет ключевую роль в защите клетки и в детоксикации в ответ на окислительный стресс, регулируя ферменты, такие как гемоксигеназа HO-1 (heme oxygenase HO-1), принадлежащая к антиоксидантам фазы II [43]. Стимуляция антиоксидантных ферментов способна предотвратить или замедлить окислительное повреждение клеток. Недавние исследования показывают, что именно фактору *Nrf2* принадлежит ключевая роль в развитии рака и хронического заболевания лёгких, в защите против антиоксидантов и защите хозяина против возбудителей, поражающих дыхательный тракт [84-86].

Эпителиальные клетки – это первичная мишень и основной источник противокислительных ферментов при респираторных инфекциях и размножении вирусов. Они синтезируют некоторые цитокины, например, интерфероны типа I (IFN α и IFN β) и другие компоненты врождённого иммунного ответа хозяина в ответ на инфекцию [87, 88]. Первичный сигнал для синтеза ИФН типа I – это узнавание двуспиральной РНК, образуемой вирусом в процессе репликации. IFN α/β , высвобождаемый заражённой клеткой, стимулирует действие медиаторов, участвующих в прекращении вирусной инфекции в клетке; он защищает также и другие, пока ещё не инфицированные клетки. Дополнительная особенность респираторной вирусной инфекции – её чувствительность к ингибиторному воздействию ИФН-индуцируемых ГТФаз (Mx GTPases, MxA), которое существенно снижает размножение вируса [87, 89].

До сих пор антиоксидантной роли *Nrf2* в модуляции интерферонового/ антивирусного ответа в эпителиальных клетках не исследовали. Однако в некоторых работах показано, что *Nrf2*-специфическая sh-РНК существенно понижает и экспрессию *Nrf2*-РНК, и экспрессию белка в эпителиальных клетках, доказывая значительное усиление проникновения вируса в клетку и его размножения в эпителии носа человека [78]. В генетических и фармакологических опытах показано, что экспрессия *Nrf2* модулирует вхождение вируса в клетку. Угнетение экспрессии *Nrf2* ускоряет вхождение вируса в клетку, а усиление её снижает проникновение вируса, защищая клетку таким образом от вирусной инфекции [78].

10. Активация *Nrf* усиливает врождённый иммунный ответ

Врождённый иммунный ответ обеспечивают механизмы, которые опосредуют и предотвращают заражение благодаря узнаванию специфических патогенов, таких как вирусы, бактерии и грибы [90, 91]. В этом ответе участвуют различные типы клеток, включая моноциты, нейтрофилы,

эозинофилы, макрофаги, тучные клетки и клетки, являющиеся природными клетками-убийцами (natural killer cells, NK cells); они отвечают на патоген или на повреждение ткани [91]. При врождённом иммунном ответе первая линия обороны обеспечивается эпителиальными клетками, а в случае дыхательной системы ключевую роль при первичной противомикробной защите играют различные эпителиальные клетки бронхов [92].

Транскрипционные факторы, такие как Nrf2, участвуют в регуляции защитных механизмов. Фактор Nrf2 стимулирует врождённый иммунный ответ, способный угнетать или удалять некоторые бактериальные и вирусные патогены [93, 94]. Исследования на животных с отключённым Nrf2 (Nrf2 null) и мышах дикого типа (wild type WT), взятых как модель пневмонии, вызываемой *Streptococcus pneumoniae*, дали возможность идентифицировать 53 Nrf2-специфических гена и проводящих пути после введения *S.pneumoniae* в легкие мышей WT [95], но не мышей Nrf2 null. Nrf2 усиливает природные защитные механизмы у мышей Nrf2 null по сравнению с контрольными WT-мышами; повышался уровень фагоцитоза, эффекторная функция Fc-рецептора, активация комплемента и иммунная регуляция глобулинов [95].

При гриппозной инфекции под прицелом находятся эпителиальные клетки верхних дыхательных путей, а защитный ответ опосредуется клетками врождённого и адаптивного иммунного ответа. В ответ на инфекцию клетки NK убивают заражённые эпителиальные клетки и выделяют цитокин – IFN- γ [96]. Хотя клетки NK выражают или регуляторно понижают экспрессию, активируя рецепторы, чтобы обеспечить противовирусный ответ, заражённые вирусом клетки могут избежать распознавания при помощи механизма, опосредованного клетками NK. Более того, вирус способен регуляторно ослаблять рецепторные лиганды, активирующие NK-клетки, и усилить участвующие в процессе ингибиторные рецепторные лиганды [97].

Активация Nrf2 участвует в праймировании клеток NK, опосредующих врождённый защитный ответ на вирусную инфекцию. В недавнем исследовании, где изучали сигнализацию IL-27 в миелоидных клетках, показано, что IL-27 опосредует регуляцию эффекторного ответа клеток NK. После заражения вирусом гриппа у мышей WT в альвеолярном пространстве и ткани лёгких появились эффекторные NK-клетки CD27⁺CD11b⁺, которых не было у мышей IL27ra^{-/-}, доказывая критическую роль IL-27 в регуляции этой популяции NK [98]. Сообщали также, что в клетках NK выражение CD27 может определять способность клеток к миграции, подтверждая, что IL-27 может усилить перемещение популяции NK к месту заражения [99,100]. Клетки NK от мышей IL-27ra^{-/-} проявляют пониженные уровни экспрессии Maf, являющегося одним из сайтов взаимодействия Nrf2 при транскрипции цитопротективных генов [98]. Выходит, что, видимо, IL-27 играет существенную роль в функциях, опосредуемых NK-клетками через транскрипционные проводящие пути, регулируемые Mafs и Nrf2, и может быть важен для регуляции адаптивного иммунного ответа, который может определять патофизиологические результаты после заражения вирусом гриппа [98].

11. Фактор Nrf2 снижает воспалительный стресс и воспаление

При воспалительном стрессе или в присутствии электрофильных компонентов клетки должны быстро повышать свою антиоксидантную способность для поддержания гомеостаза и стремиться противодействовать усиленному образованию ROS. Активация Nrf2-сигнализации усиливает экспрессию генов-мишеней Nrf2, кодирующих важные защитные ферменты – NAD(P)H : хиноноксидоредуктазы NQO1 [NAD(P)H : quinone oxidoreductase NQO1], HO-1, GCL, GST, каталазы (catalase, CAT), супероксиддисмутазы (superoxide dismutase, SOD), альдокеторедуктазы (aldo-ketoreductase), γ -глутамилцистеинлигазы (γ -glutamyl cysteine ligase), тиоредоксина (thioredoxin) и тиоредоксинредуктазы (thioredoxin reductase) [101-105].

Фактор Nrf2 контролирует регуляторную сеть генов, обеспечивающих окислительно-восстановительный гомеостаз, а его активация усиливает экспрессию нескольких цитопротективных генов, восстанавливающих этот гомеостаз. Nrf2 связан, главным образом, с ферментами антиокисления и детоксикации, с другими клеточными переносчиками [106-107], с

ферментами, исключаяющими вхождение в клетку ксенобиотических метаболитов и токсических соединений [108], и с некоторыми компонентами протеасом [101-105]. Nrf2 усиливает также экспрессию молекулярных шаперонов/белков теплового шока и ответу белков, отвечающих за исцеление ран [110].

При этом Nrf2 не только регулирует механизмы защиты клетки против окислительного стресса, но активация этого фактора вызывает противовоспалительное действие и играет важную роль в снятии воспаления [50, 94, 111]. Проводящие пути Nrf2 и NFκB совокупно контролируют стресс и ответы на воспаление. Исследования на многочисленных экспериментальных моделях показывают, что Nrf2 может противостоять воспалительному ответу, запущенному NFκB [112-114]. При активации липополисахаридами NFκB стимулируется, индуцируя Nrf2, который регуляторно повышает экспрессию HO-1, приводя к снижению воспалительной активности NFκB [115-116]. В опытах *in vivo* на мышах Nrf2^{-/-}, заражённых респираторным синцитиальным вирусом, у животных повысилось вызванное вирусом воспаление, увеличились метапластические изменения клеток и клиренс вируса; в то же время предварительная обработка мышей Nrf2^{+/-} и мышей Nrf2^{-/-} эффективным активатором Nrf2 привела к увеличению уровней антиоксидантов, усилила клиренс вируса и снизила связанное с вирусом воспаление [54].

При инфекции SARS-CoV-2 повреждение тканей у некоторых больных были связаны с так называемым цитокиновым штормом ("cytokine storm"); это тип системного воспаления, вызванного инфекцией, когда лейкоциты активируются, синтезируя воспалительные цитокины [117]. Так как воспаление – это ключевой момент для эффективного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, то избыточный и слишком длительный цитокиновый ответ может вызвать ARDS или же полифункциональные нарушения, приводя к физиологическим ухудшениям и смерти [118]. Клинические исследования при критических состояниях у больных с COVID-19 обнаруживают повышенный уровень экспрессии цитокинов; выходит, что супрессоры цитокинов могли бы воспрепятствовать поражениям, снижая частоту смертности [119].

Изучение молекулярных основ воздействия Nrf2 показывает, что функции Nrf2 не только решающим образом регулируют внутриклеточный ROS, но и так же и провоспалительную экспрессию цитокинов [111]. Фактор Nrf2 ингибирует вызванную LPS экспрессию генов *IL6* и *IL1b* через ROS-независимое торможение транскрипции, и связывание его с проксимальными участками генов *IL6* и *IL1b* приводит к тому, что Nrf2 затормаживает транскрипцию, прямо связываясь с ДНК. Более того, исследования показывают, что опосредованное Nrf2 затормаживание экспрессии генов воспалительных цитокинов в макрофагах M1 зависит от ARE [111]. Хотя мы точно не знаем, как Nrf2 регуляторно понижает экспрессию генов-мишеней, кодирующих воспалительные цитокины, ясно, что повышение уровней Nrf2 могло бы помочь разбить самовозобновляющийся цикл событий, ведущих к цитокиновому шторму, и помочь больным скорее излечиться от инфекции COVID-19 (см. рис. 3).

12. Низкие уровни экспрессии Nrf2 у лиц преклонного возраста

Старение определяют как хроническое заболевание с медленно текущим воспалительным процессом (chronic low grade inflammatory stage) [120, 121]. При старении наблюдают снижение уровней белка Nrf2 и экспрессии его мРНК в различных тканях, включая мозг и сердце. Это связано с увеличением количества генов-мишеней NFκB; это гены молекул внутриклеточной адгезии 1 (ICAM-1 intercellular adhesion molecule 1) и ИЛ-6 (IL-6, interleukin 6); вместе с тем падает выражение генов-мишеней Nrf2 (NQO1, γ-GCS, HO-1) [122, 123].

Более низкое содержание и снижение активации Nrf2 в ядре наблюдали у старых животных и людей старшего возраста (свыше 65 лет) по сравнению с молодыми [124, 125]. . Время, в течение которого Nrf2 остаётся активным, зависит от стимула, созданного индуктором, а также от возраста животных [126]. На нескольких моделях *in vivo*, используя мышей с отключённым

геном Nrf2, обнаружили повышенный ответ на воспаление. Наоборот, активация проводящего пути Nrf2 вновь возвращает окислительно-восстановительное равновесие, вызывая восстановление клеток и ограничивая появление свободных радикалов и фактора некроза опухолей [79, 127, 128]. При старении клетки наблюдают снижение функции Nrf2, и её бездействие приводит к раннему старению эмбриональных фибробластов человека [129] с низкой ожидаемой продолжительностью жизни [130]. Фактор Nrf2 регулирует работу многочисленных ферментов, таких как супероксиддисмутаза 1 (superoxide dismutase 1, SOD1), способная в некоторых условиях предупредить старение и воспаление [131, 132]. Активация Nrf2 не только вызывает противовоспалительный ответ, но и участвует в воспалении и, возможно, выполняет важную функцию в защите клетки и в гомеостазе [22].

Кроме того, снижение экспрессии Nrf2 опосредует, по-видимому, заметное снижение выживания стволовых/прародительских клеток и регенерацию в среднем возрасте, подтверждая, что старение может быть связано со снижением экспрессии Nrf2 и компенсаторного ответа Nrf2 на окислительный стресс [133]. Выходит, что снижение уровней Nrf2 у людей преклонного возраста может быть связано с большей тяжестью заболевания, вызванного SARS-CoV-2.

13. Nrf2, воспаление и ожирение

По данным CDC, ожирение принадлежит к факторам риска, которые могут повысить тяжесть инфекции COVID-19. Фурукава с коллегами (Furukawa et al., 2017) описал окислительный стресс как один из основных факторов, причастных к смертности, связанной с ожирением, и представляется, что Nrf2 будет перспективной мишенью при лечении ожирения [134]. По-видимому, этому фактору принадлежит важная роль в подготовке преадипоцитов к дифференциации их до адипоцитов [135-137]. Активация Nrf2 снижает адипогенез или общее количество триглицеридов в зрелых дифференцированных адипоцитах [136]. Функция Nrf2 в обмене жиров и глюкозы осуществляется через регуляцию экспрессии многочисленных адипогенных и липогенных генов, включая гены *FABP4*, *CEBPA*, *CEBPB*, *SREBF1*, *PPARG*, *FASN* (*fatty acid synthase*) и ацетил-КоА-карбоксилазу (*ACACA* и *ACACB*), изменение функции пентозо-фосфатного проводящего пути и синтез NADPH. Недостаток Nrf2 повреждает активацию белка Akt и активность переносчика глюкозы 4 (glucose transporter type 4, Glut4) в ответ на инсулин [138]. Исследования *in vitro* с использованием адипоцитов указывают, что активация Nrf2 при ожирении может принести пользу и смягчить вызванное ожирением воспаление и в жировых клетках, и в культивируемых с ними совместно макрофагах [81]. Активация Nrf2 видоизменяет функцию адипоцитов и препятствует нарушению регуляции и инсулинорезистентности у мышей с липодистрофией через угнетение ферментов печени, участвующих в липидогенезе *de novo*. В то же время у животных с недостаточностью Nrf2 такого не наблюдали [135]. Кроме того, активация сигнального пути ERK/JNK и митоген-активируемой протеинкиназы p38, а также ингибирование AhR и повышенная экспрессия эстрогеновых рецепторов взаимосвязаны с системным противовоспалительным действием Nrf2 при ожирении [81].

Исследования на мышинной модели при диете с высоким содержанием жиров (high fat diet, HFD) показывают, что изменения на уровне окислительного стресса, ухудшенного использования жиров, инсулиновой сигнализации и развитие ожирения могут быть сняты под действием олтипраза (oltipraz) – активатора Nrf2 [139]. Длительное применение HFD привело к снижению содержания Nrf2 в жировой ткани вместе со снижением уровня белка-мишени Nrf2, доказывая, что HFD способна привести к нарушению эндогенной антиоксидантной системы Nrf2, играющей важную роль в повреждении инсулиновой сигнализации и энергии гомеостаза [139]. Животные, которым вводили олтипраз, обрели устойчивость к ожирению, вызываемому HFD. Так как активация Nrf2 мешает дифференциации адипоцитов, то польза от введения активатора Nrf2 мышам с ожирением, вызванным HFD, обусловлена, по-видимому, прямой задержкой

дифференциации адипоцитов [140, 141]. Исследования доказывают основную роль антиоксидантной системы Nrf2 в предотвращении и развитии инсулинорезистентности и ожирения. Показано, что индукция Nrf2-зависимых антиоксидантных ферментов может снижать оксидативный стресс и послужить борьбе против ожирения и связанной с ним инсулинорезистентностью [139].

14. Nrf2 смягчает окислительный стресс, связанный с гипергликемией

При недавних исследованиях обнаружили что осложнения, связанные с ожирением, такие, как диабет, являются фактором риска при инфекции COVID-19. Согласно недавним сообщениям и данным CDC, существует взаимосвязь между тяжёлым ожирением и смертностью от коронавируса. Хотя до сих пор имели дело с небольшим количеством больных, Стефан с коллегами (Stefan et al., 2020) сообщают, что в случае больных с избыточным весом механическая вентиляция лёгких понадобилась в 85% случаев, а 62% таких больных умерли, в то время как при отсутствии ожирения механическая вентиляция проводилась в 62% случаев, а умерло 36% таких больных. Учитывая, что сахарный диабет (diabetes mellitus, DM) сильно взаимосвязан с увеличением массы жировой ткани, показано, что высокий индекс массы тела (body mass index, BMI) может быть важным фактором риска тяжелого состояния у этих больных [142].

DM сопровождается многими расстройствами обмена из-за снижения секреции или активности инсулина, приводя к гипергликемии и другим осложнениям. Диабет типа 1 вызывается аутоиммунным разрушением панкреатических β -клеток, что приводит к недостатку инсулина и диабету [143]. DM типа 2 – это инсулиннезависимый диабет, он развивается у лиц, наследственно предрасположенных, и усиливается с возрастом. Он связан с резистентностью к инсулину и с гиперинсулинемией, недостаточностью β -клеток и последующей инсулиновой недостаточностью [144]. DM типа 2 характеризуется гипергликемией, гиперинсулинемией и воспалением, ведущим к состоянию, благоприятному для окисления, к возросшему синтезу ROS и к снижению экспрессии противокислительных ферментов [145-151]. Таким образом, регуляторное усиление генов, кодирующих детоксикацию, антиоксидантных генов и противовоспалительных медиаторов может стать важным лечебным подходом для защиты против воспаления и оксидативного стресса, которые усиливаются при DM [152].

Активация Nrf2 может усилить экспрессию, противоборствуя с условиями, которые способствуют окислению, и прямо осуществляя детоксикацию ROS, усиливая антиоксидантную защиту клетки, способствуя улучшению функции митохондрий, вызывая экспрессию ферментов пентозо-фосфатного проводящего пути, сохраняя функцию эндотелия и снижая уровни глюкозы в крови [153-156]. Исследования показывают, что активация Nrf2 выше на ранних фазах DM и снижается на поздних стадиях, и у животных с недостаточностью Nrf2 больше наблюдаются повреждения и дальнейшие осложнения [157]. Более того, при клинических испытаниях оказалось, что при печёночной резистентности к инсулину (hepatic insulin resistance) бардоксолонметил (bardoxolone-methyl, CDDO-Me), производное естественного соединения – олеаноловой кислоты (oleanolic acid), может через активацию Nrf2 принести пользу диабетикам, страдающим из-за хронического заболевания почек [158]. Так как Nrf2 – основной фактор транскрипции при синтезе цитопротективных и антиоксидантных ферментов, представляется, что он может стать мишенью для ослабления окислительного стресса, связанного с гипергликемией [169].

15. Роль флавоноидов как противовирусных соединений и активаторов Nrf2

Флавоноиды – это семейство полифенольных соединений, которые были обнаружены в растениях; они обладают многочисленными фармакологическими свойствами, включая противокислительные, противовоспалительные, противораковые, антибактериальные, противогрибковые и противовирусные [160]. Доказана противовирусная активность флавоноидов

по отношению к нескольким вирусам, включая вирусы простого герпеса 1 и 2, цитомегаловирус человека и некоторые типы человеческих аденовирусов [161-163]. Многие из этих полифенольных соединений, включая апигенин (apigenin), лютеолин (luteolin), кверцетин (quercetin), аметофлавон (amentoflavone), даидзеин (daidzein), пуэарин (puerarin), эпигаллокатехин (epigallocatechin), эпигаллокатехингаллат (epigallocatechin.gallate), галлокатехингаллат (gallocatechin gallate) проявляют противовирусную активность, затормаживая протеолитическую активность 3С-подобной протеазы (3С-like protease) SARS-CoV, жизненно важной для размножения этого вируса [164, 165].

Хотя многие флавоноиды могут активировать транскрипционный фактор Nrf2, работы, касающиеся двух флавоноидов, показали, в частности, большие возможности этих двух соединений, и не только как индукторов Nrf2, но как противовирусных соединений. Это эпигаллокатехин-3-галлат и тимохинон, которые уже поступили на рынок и продаются как пищевые добавки.

15.1. Эпигаллокатехин-3-галлат

Показано, что добавление флавоноидов вызывает экспрессию гена Nrf2 [166, 167]. В некоторых странах одним из наиболее употребляемых напитков, полезных для здоровья, является зелёный чай [168]. Для его первичных полифенолов (они называются также катехинами) описано противораковое, противоокислительное и антимикробное действие [169, 170]. Эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) считается основным активным компонентом зелёного чая, и в сухих чайных листьях на него приходится примерно 59% от общего количества полифенолов. Ксу с коллегами (Xu et al., 2017) перечислили несколько публикаций, касающихся противовирусного воздействия катехинов зелёного чая; оно направлено против ДНК-содержащих вирусов (вирус гепатита В, вирус герпеса, вирус Эпштейна–Барр и аденовирусы) и РНК-содержащих вирусов (ВИЧ, вирус гепатита С, вирус гриппа, некоторые арбовирусы, Т-клеточный лимфотропный вирус-1 человека, ротавирусы и энтеровирусы, EBOV²) [171]. Соединение EGCG – это мощный антиоксидант, действующий через удаление ROS и реактивных видов азота, синтез защитных ферментов и хелирование и связывание двухвалентных металлов [172].

Лемберт с сотрудниками (Lambert et al., 2010) оценивали гепатотоксичность EGCG при введении мышам высоких доз через рот [173]. Их результаты показали, что дозы EGCG, при которых проявлялась токсичность, соответствуют примерно 10.5-30 чашкам зелёного чая; это избыточно для употребления на день. Выходит, эти данные не свидетельствуют, что потребление чая представляет существенный риск с точки зрения гепатотоксичности. Авторы говорят, что риск токсичности мог бы возникнуть при высоких дозах диетических добавок, содержащих концентрированные или очищенные препараты чая [173]. Но сами по себе эти дозы лежат вне токсического диапазона, определённого в этой работе, но они сходны с дозами добавок зелёного чая, которые связаны с гепатотоксичностью у человека, сообщёнными при описании случаев, и возможность достичь токсического порога при превышении рекомендованной дозы не достоверна [174, 175].

При клиническом испытании оценивали безопасность применения катехинов зелёного чая в дозе 400 мг EGCG при разделении дозы (дважды в день) в условиях, когда больные не голодали. Приём EGCG не вызывал токсичности для печени или какой-то иной токсичности у мужчин с повышенным риском рака простаты, которые были объектом этого исследования. Полученные результаты показывают, что приём стандартизованной бескофеиновой смеси, содержащей 400 мг EGCG в день (в двух дозах) в течение года с пищей (без голодания), когда катехины накапливаются в плазме, хорошо переносится и не вызывает каких-либо побочных воздействий [176]

² Не нашла, что за вирус.

Показано, что в отсутствие инфекции добавление EGCG повышает уровни экспрессии Nrf2-зависимых генов и антивирусных медиаторов и блокирует входение вируса в эпителиальные клетки носа [78]. При помощи генетических и фармакологических методов показали экспрессию Nrf2 в эпителиальных клетках носа человека, экспрессирующих sh-РНК (shRNA), нацеленных на Nrf2; угнетение экспрессии Nrf2 повышает входение вируса в клетки, тогда как ее усиление снижает проникновение вируса гриппа А в клетку [78].

При отсутствии инфекции добавка EGCG увеличивает уровни белка Nrf2 и вызывает экспрессию мРНК генов антивирусного ответа, включая *RIG-1*, *IFN-β* и *MxA* [78]. Экспрессия этих генов обычно стимулируется при вирусных инфекциях, когда усиленная продукция интерферонов типа I ведёт к синтезу антивирусных генов, вызывая «антивирусное состояние» и ограничивая размножение вируса [177]. Сообщали, что белок MxA, принадлежащий к небольшому семейству ГТФаз (GTPases), тормозит размножение вируса и обладает антивирусной активностью по отношению к вирусу гриппа А [177]. Оказалось, что фермент RIG-1, РНК-геликаза из цитозольного бокса DEхDX (она работает вместе с двуспиральной РНК), усиливает синтез интерферона в ответ на вирусную инфекцию [178, 179]. Авторы предполагают, что EGCG регуляторно усиливает синтез этих антивирусных генов, которые защищают клетки от вирусной инфекции, создавая «антивирусное защитное состояние» [78]. Хотя на промоторах генов *RIG-1*, *IFN-β* и *MxA* не найдено сайтов для прикрепления Nrf2, эта возможность предполагается; таким образом, индукция Nrf2 усиливает, по-видимому, транскрипцию этих противовирусных генов [78].

EGCG обладает мощными противоокислительными свойствами, усиливая экспрессию некоторых антиоксидантных ферментов [180]. Исследования, проведённые *in vivo in vitro*, показывают, что EGCG стимулирует экспрессию антиоксидантных генов на фазе II; эти гены связаны с сигнализацией Nrf2-EpRE [166, 181-183]. Хотя Wu с сотрудниками (Wu et al., 2006) указывают, что механизм индуцирования Nrf2 включает фосфорилирование серина и треонина и увеличивает его накопление в ядре и присоединение к EpRE [184], всё ещё неизвестно, каким же образом активация Nrf2-зависимых генов участвует в антивирусных воздействиях этого фактора [78]. Полученные данные свидетельствуют, что транскрипция фактора Nrf2 – это ключевая предпосылка, обуславливающая чувствительность к вирусной инфекции на эпителиальном уровне и что добавка в пищу EGCG повышает уровни белка Nrf2 и усиливает экспрессию антивирусных медиаторов при отсутствии вирусной инфекции [78].

15.2. Тимохинон

Полифенол тимохинон (thymoquinone – 2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone, TQ) – это важный компонент чёрного кумина (black cumin, *Nigella sativa*³), тысячелетиями использовавшийся как пряность и пищевой консервант, а также как профилактическое и лекарственное средство при многочисленных недугах; известно многое о его традиционном применении в официальной медицине [185, 186]. В недавно опубликованном обзоре Молла с сотрудниками (Molla et al., 2019) описывают противовирусное действие *Nigella sativa* и ее компонентов против ряда патогенных вирусов человека, животных, птиц и растений, как, например, против мышинного цитомегаловируса, вируса гриппа птиц (H9N2), инфекции *Schistosoma mansoni*, вируса PPR, вируса мозаики бобов (broad bean mosaic virus), ВИЧ, вируса гепатита С, вируса жёлтой мозаики цуккини (zucchini yellow mosaic virus), вируса кольцевой пятнистости папайи (papaya ring spot virus); предполагается, что *Nigella sativa* может быть одним из лучших источников противовирусных лекарств [187]. Кроме того, установлено, что *N. sativa* – это безопасный растительный продукт [188]. Клинические исследования по проверке семян чёрного тмина и его активного компонента, TQ, обнаружили, что введение их не вызывает побочных воздействий со стороны печени, почек или желудочно-кишечного тракта [189, 190]. Применение

³ По-русски это называется также «чёрнушка» и «чёрный тмин», а по-украински – «чорний кмин» .

их безопасно в случае больных с *diabetes mellitus* типа 2, не вызывая никаких проблем с почками или печенью [191]. Кроме того, применение семян *N.sativa* не влияет на уровни сывороточной аланин-аминотрансферазы (serum alanine aminotransferase, ALT) или сывороточного креатинина (creatinine, Cr) у взрослых [192].

Сообщали, что TQ сильно воздействует на окислительный стресс и на воспаление [193]. Описано, что он вызывает экспрессию многих цитопротективных ферментов, как, например, глутатион-S-трансферазы [191-196], глутатионпероксидазы [195], глутатионредуктазы [195] и супероксиддисмутазы [196]. Во время болезни, когда происходит окислительный стресс, в клетках активируется ряд цитопротективных ферментов, защищающих клетки от окисления, например, HO-1 (heme oxygenase-1), при активации которой смягчается оксидативное и воспалительное повреждение тканей [197]. В клетках кератоцитов TQ повышает уровни HO-1 и на уровне мРНК, и на уровне белка, а его влияние на проводящий путь, опосредованный Nrf2, показывает, что вызванная под действием TQ экспрессия HO-1 зависит от активации Nrf2. Полученные данные доказывают, что TQ работает как прооксидант, что приводит к активации сигнала Nrf2 и стимулированию экспрессии HO-1 в клетках кератоцитов HaCaTa [198]. В механизме, по которому TQ стимулирует активацию Nrf2 и экспрессию HO-1, не участвуют MAP-киназы, но происходит фосфорилирование AMPK α и киназы Akt и снижается экспрессия PTEN [198], негативного регулятора фосфорилирования Akt [199].

В клетках BV-2, происходящих из микроглии крыс, обработанных LPS, TQ затормаживает высвобождение TNF α , IL-6, IL-1 β и простагландина E2 (prostaglandin E2, PGE2) [200]. При этом TQ снижает уровни белка iNOS, ингибитора фосфорилирования kB, а также присоединение NBkB к ДНК; это доказывает, что действие TQ осуществляется путем затормаживания NBkB-зависимого нейровоспаления, в котором участвуют NBkB-опосредованные провоспалительные нейромедиаторы, участвующие в воспалении и в синтезе ROS [201]. Кроме того, TQ увеличивает накопление Nrf2 в ядре, усиливая присоединение Nrf2 к ARE, увеличивая его транскрипционную активность, а также повышая уровни белков NQO1 и HO-1. Результаты подтверждают взаимосвязь между активирующим воздействием TQ на проводящий путь Nrf2/ARE и тормозящим воздействием TQ при нейровоспалении, опосредованном NBkB [200]. Исследования, проводимые на больных при инфекции SARS-CoV-2 и в условиях *in vitro*, свидетельствуют, что нейроинвазивное воздействие CoV и его распространение из дыхательных путей в центральную нервную систему (ЦНС) может осуществляться через ретроградный перенос аксонами от периферических нервов или же через кровь [202]. Результаты показывают, что оказавшись в ЦНС, CoV может вызывать гибель нейронов у мышей [203]. Ли с сотрудниками (Li et al., 2020) предполагают, что нейроинвазивное действие SARS-Cov-2, оказываемое главным образом на медуллярные структуры, участвующие в дыхании, могут как-то опосредовать повышенную частоту дыхательной недостаточности, наблюдаемой при инфекции COVID-19 [204]. При инфекции SARS-CoV рецептор ACE2 выражается также в нейронах и в глии. Экспериментальные исследования при использовании интраназального заражения препаратом SARS-CoV-1 ACE2-трансгенных мышей доказывает гибель нейронов и усиление регуляции синтеза провоспалительных цитокинов нейронами и астроцитами [203]. Периферические миелиодные клетки, зараженные CoV [202], могут рекрутироваться или трансмигрировать в ЦНС из-за повышенной проницаемости гемато-энцефалического барьера, вызванного воспалением или психологическим стрессом. В ЦНС заражённые вирусом моноциты могут распространять нейровоспаление, высвобождая воспалительные цитокины и вызывая активацию микроглии [205, 206]. Есть доказательства, что CoV может персистентно заражать лейкоциты [207-208] и, таким образом, продолжительность времени, в течение которого заражённые вирусом клетки иммунной системы могут служить источником воспаления, может оказаться значительно большей, чем ранняя инфекция и состояние, при котором проявляются острые симптомы болезни [209].

Учитывая вредное воздействие окислительного стресса и нейроинвазивные особенности коронавирусной инфекции, изложенные здесь данные доказывают, что лечение с использованием TQ может приводить к активации Nrf2 и вызвать экспрессию HO-1, а также затормаживать высвобождение провоспалительных цитокинов, что поможет предупреждению инфекции COVID-19 или смягчит ее тяжесть.

16. Добавка витамина D3 и усиление иммунного ответа

Установлено, что витамин D3 является пищевым компонентом, влияющим на здоровье иммунной системы и усиливающим защиту против инфекций. В лёгких фермент 1 α -гидролаза превращает витамин в его активную форму, 1,25-дигидроксивитамин D3 (1,25-dihydroxyvitamin D3) – самый мощный метаболит витамина D [210]. Он играет ключевую роль как медиатор воспаления и иммунного ответа. Витамин D опосредует NF κ B-сигнализацию и продукцию цитокинов при инфекции, контролируя иммунный ответ эпителиальных клеток дыхательных путей [211]. Он индуцирует I κ B α , приводя к понижению стимуляции NF κ B-зависимых генов через вирусную инфекцию, снижая высвобождение воспалительных цитокинов [212]. Кроме того, витамин D повышает экспрессию CD14 и кателицидина (cathelicidin), помогая распознаванию и элиминации вирусов [212, 213]. Снижение уровней витамина D может привести к провоспалительному фенотипу, который способен усилить тяжесть заболевания. Понижение этих уровней связывают с повышением уязвимости перед инфекциями и с повышением риска респираторных заболеваний, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь лёгких, а также с недостаточностью функции лёгких, когда у организма снижается способность справляться с респираторными инфекциями [211, 214].

Исследования показывают, что у лиц с уровнем 25(OH)D ниже 16 нг/мл респираторные заболевания встречаются чаще, чем в случае более высоких его уровней [215], а у лиц с уровнем 25(OH)D свыше 38 нг/мл наблюдают значительное снижение заболеваний дыхательных путей [216]. Кроме того, обследование лиц, находившихся в палатах интенсивной терапии, показывает, что недостаточность витамина D связана с тяжелой инфекцией, более длительным лечением и повышенной смертностью [217, 218]. Далее, более высокую смертность наблюдали среди больных с приобретённой пневмонией, у которых уровень 25(OH)D оказался ниже 12 нг/мл [219]. Исследования обнаруживают, что витамин D может усиливать иммунный ответ и опосредовать каскады воспалительных реакций, снижая вероятность тяжёлых инфекций [211]. В придачу, недавние работы свидетельствуют, что уровни выражения Nrf2 оказались заметно выше в обработанных 1,25(OH)2D3 мышечных эмбриональных фибробластах линии WT, но не у мышей с выключенным геном рецептора витамина D (vitamin D receptor, VDR); оказалось, что VDR способен связывать Nrf2. Кроме того, отсутствие Nrf2 снижает экспрессию генов-мишеней Nrf2, указывая, что 1,25(OH)2D3 обладает антиоксидантной функцией в транскрипционной регуляции, которую Nrf2 осуществляет через VDR. Полученные данные доказывают, что недостаточность 1,25(OH)2D3 усиливает окислительный стресс, затормаживая транскрипцию Nrf2 и усиливая повреждения ДНК [220]. Всё это вместе взятое показывает, что добавление витамина D может снизить риск тяжёлых инфекций, в частности, тех из них, которые поражают дыхательные пути, в частности, SARS-CoV-2.

Недавние исследования указывают, что недостаточность витамина D может иметь большее значение, чем предполагалось; это касается и стран, где нет недостатка в солнце. Не приходится больше предполагать, что недостаточность витамина D – это проблема только стран, расположенных в северных широтах [221]. Показано, что недостаточность витамина D широко распространена, вопреки обилию солнца, в таких странах, как Бразилия, что это проблема мирового здравоохранения [222,223].

Таким образом, мы считаем, что приём с пищей EGCG и TQ должен сочетаться с приёмом витамина D3, даже если речь идёт о странах, где люди подвергаются воздействию солнечной

радиации (UVB) в течение всего года; это важно для иммунных механизмов в борьбе с вирусными инфекциями.

17. Выводы

В этой гипотезе мы обсудили защитную роль транскрипционного фактора NRF2 и его взаимосвязь с тяжестью инфекции SARS-CoV-2. При этом Nrf2 играет важнейшую роль в модулировании чувствительности к вирусной инфекции на уровне эпителия и защищает клетки от вирусной инфекции, уменьшая окислительный стресс, воспаление и экспрессию рецепторов ACE2, количество которых во время инфекции SARS-CoV-2 возрастает. У лиц преклонного возраста и лиц с предрасполагающими проблемами со здоровьем или при угнетении иммунитета уровни Nrf2 понижаются, что связано, по-видимому, с более высоким риском развития более серьезных осложнений при COVID-19. Активация Nrf2 способна модулировать Nrf2-зависимые противовирусные модуляторы до начала вирусной инфекции и ограничить вход вируса в клетку и его размножение. Таким образом, Nrf2 может стать новой мишенью, воздействуя на которую можно воспрепятствовать инфекции SARS-CoV-2 и даже смягчить тяжесть недуга, уменьшая окислительный стресс, смягчая процессы воспаления (которые могут привести к цитокиновому шторму) и регуляторно понижая экспрессию рецепторов ACE2.

Более того, мы предлагаем новый взгляд на мишень и на усиление активации Nrf2 с использованием флавоноидных компонентов в сочетании с витамином D3. При этом EGCG и тимохинон – это естественные компоненты, уже использовавшиеся ранее как пищевые добавки. Описано, что они активируют Nrf2-зависимые гены, действующие в поддержку процесса, стимулируя у хозяина появление состояния противовирусной защиты. Кроме того, приём витамина D значительно снижает развитие острых респираторных недугов дыхательных путей, опосредуя воспаление и иммунный ответ через модуляции проводящих путей NFκB и продукцию цитокинов во время инфекции. Недостаточность витамина D тоже увеличивает окислительный стресс, затормаживая транскрипцию Nrf2 и усиливая повреждение ДНК; это доказывает, что прием витамина D3 может благотворно воздействовать на активацию транскрипционного фактора Nrf2.

Следовательно, мы в нашей гипотезе утверждаем, что сочетание EGCG, TQ и витамина D3 может активировать Nrf2-зависимые гены и защищать клетки против вирусной инфекции; это сочетание можно использовать для предотвращения вирусных инфекций, например, SARS-CoV-2. При таком подходе важно учесть, что эти добавки дают результат только при сочетанном их применении; тогда они могут быть нацелены на Nrf2 и его активировать. Сейчас эти добавки уже есть на рынке и могут приниматься каждая отдельно, но мы утверждаем, что приём витамина D3 способен усилить действие добавок EGCG и TQ, активируя Nrf2-зависимые гены, защищающие клетку; они действуют как подмога, стимулируя у хозяина защиту против вируса⁴. Необходима дальнейшая работа и клинические исследования, чтобы обеспечить терапевтический результат влияния EGCG, TQ и витамина D3 как активаторов Nrf2 и установить их клиническую пользу при предотвращении и лечении инфекции SARS-CoV-2 (рис. 4).

⁴ Впечатление повтора.