

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

А.Н. СИЗЕНЦОВ, Р.М. НУРГАЛИЕВА

ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

Рекомендовано Ученым советом государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Оренбургский государственный университет в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по специальности «Микробиология»

Оренбург – 2007

УДК 578 (075.8)

ББК 28.3я73

С 34

Рецензент

доктор медицинских наук, ст.н.с. Ю.А.Брудастов

Сизенцов А.Н.

**С 34 Общая вирусология: учебное пособие / А.Н. Сизенцов,
Р.М. Нугалиева. – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2007.
ISBN**

Учебное пособие представляет собой систематизированное изложение разделов «Общей вирусологии» в полном соответствии с Государственным общеобразовательным стандартом.

В учебном пособии представлены общие сведения о вирусах, основные этапы развития вирусологии как отдельной науки, история вирусологии, химический состав и морфология вирусов, а также методы профилактики вирусных инфекций.

Учебное пособие рекомендовано для студентов медицинских и биологических специальностей

1905000000
С

ББК

ISBN

© Сизенцов А.Н., Нугалиева Р.М., 2007
© ГОУ ОГУ, 2007

Содержание

Введение	5
1. История вирусологии, природа и происхождение вирусов	6
1.1. Открытие вирусов	6
1.2. Периоды развития вирусологии	8
1.3. Природа вирусов	11
1.4. Происхождение вирусов	13
1.5. Роль вирусов в эволюции	14
2. Химический состав вирусов	15
2.1. Белки	20
2.2. Липиды	23
2.3. Углеводы	24
3. Морфология, морфогенез и биофизические свойства вирусов	25
3.1. Архитектура вирионов	25
3.2. Морфогенез вирусов	27
3.3. Биофизические свойства вирусов	28
3.4. Устойчивость вирусов в окружающей среде	29
3.5. Классификация вирусов	29
3.6. Репродукция вирусов	31
3.6.1. Адсорбция	32
3.6.2. Проникновение вирусов в клетку	33
3.6.3. Раздевание	37
3.6.4. Транскрипция	38
3.6.5. Трансляция	42
3.6.6. Репликация	49
3.6.7. Сборка вирусных частиц	52
3.6.8. Выход вирусных частиц из клетки	56
3.7. Репликативный цикл некоторых групп вирусов	56
3.7.1. + РНК-вирусы	56
3.7.1.1. Пикорнавирусы	56
3.7.1.2. Тогавирусы	58
3.7.1.3. Ретровирусы	59
3.7.2. Репликация РНК-вирусов с минус- и двойными цепями РНК	60
3.7.2.1. – РНК-цепи	61
3.7.3. Двухцепочечные РНК-вирусы	63
3.7.3.1. ДНК содержащие вирусы	64
4. Генетика вирусов	70
4.1. Структурная организация генома клетки	70
4.2. Структурная организация генома вируса	71
4.3. Способы увеличения информационной емкости вирусного генома	72
4.4. Основные процессы, контролирующие наследственность и изменчивость вирусов	74
4.5. Генетические и негенетические взаимодействия между вирусами	75
4.6. Рестриктазы и физические карты вирусов	78
5. Патогенез вирусных инфекций	80

5.1. Классификация вирусных инфекций на клеточном уровне	80
5.2. Цитология зараженной вирусом клетки	84
5.3. Классификация вирусных инфекций на уровне организма	87
5.4. Патогенез вирусных инфекций	89
5.4.1. Пути проникновения вируса в организм	90
5.4.2. Распределение вирусов в организме	91
5.5. Группы вирусов вызывающие массовые заболевания	92
6. Противовирусный иммунитет	94
6.1. Вирусные антигены	97
6.2. Гуморальный иммунитет	97
6.3. Клеточный иммунитет	98
6.4. Экология вирусов	100
6.5. Эпидемиология вирусных инфекций	101
6.6. Иммунопрофилактика вирусных инфекций	103
7. Бактериофаги	107
7.1. Морфология бактериофагов	107
7.2. Размножение вирулентного фага: литический цикл	107
8. Прионы	112
8.1. Прионы – новый класс возбудителей инфекций	112
8.2. Классификация прионных болезней	114
8.3. Генетика прионных болезней	115
8.4. Морфология	116
8.5. Изоформы прионов	121
8.6. Прионы и видовой барьер	121
8.7. Устойчивость прионов	122
Список использованных источников	124

Введение

Вирусы – мельчайшие неклеточные биологические объекты, обширная группа уникальных микроорганизмов, расположенных на границе жизни, отличительны» ми признаками которых являются обязательный паразитизм на генетическом аппарате живых клеток (растений, бактерий, насекомых, животных) и наличие в геноме вируса нуклеиновой кислоты только одного типа. Вирусами поражены все формы жизни от растений и бактерий до человека. Способность вирусов вносить новую информацию в генетический аппарат клетки-хозяина определяет их роль важнейшего фактора изменчивости и биологической эволюции всего живого. Наконец, с вирусами связывают возникновение опухолей, атеросклероза, диабета, разнообразных нервно-психических заболеваний и другой инфекционной патологии. Современная вирусология, зародившись в недрах микробиологии, вышла за ее пределы и превратилась в фундаментальную самостоятельную научную дисциплину со специфическим объектом изучения, чрезвычайно важную в теоретической подготовке и практической деятельности врача, поскольку вирусные инфекции составляют большую часть инфекционной патологии человека. Быстрому прогрессу вирусологии способствуют постоянное совершенствование методов вирусологических исследований, использование достижений молекулярной биологии, генетики, биохимии, физики, математики. Возросший успех к вирусологии находит отражение в повсеместном расширении ее преподавания. Притягательность этой науки обусловлена рядом объективных обстоятельств.

Вирусы как элементарная единица жизни идеальный объект для молекулярных биологов и генетиков. Неслучайно на вирусах сделаны величайшие биологические открытия XX столетия расшифровки генетического кода и механизма синтеза белка и нуклеиновых кислот.

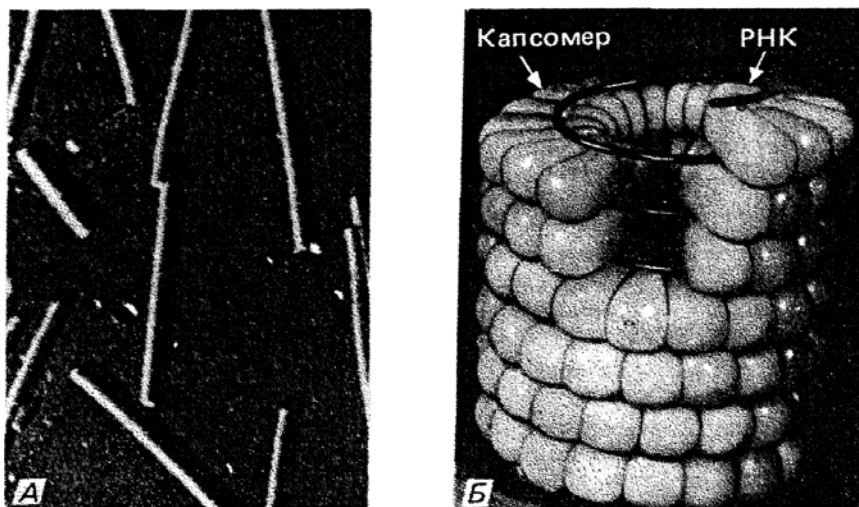
Многие опухоли животных индуцированы вирусами, это уже доказано. В 60-х годах впервые была выдвинута вирусогенетическая теория происхождения опухолей человека, и сейчас вирусологи активно включились в изучение их природы. На модели вирусов разрабатываются важнейшие вопросы философии.

В последние десятилетия на фоне существенного снижения эпидемических бактериальных инфекции резко возрос удельный вес вирусных инфекционных заболеваний человека. Считают, что они составляют до 80% всей инфекционной заболеваемости. Грипп, аденовирусные инфекции, вирусные гепатиты и другие инфекции вирусной природы продолжают наносить большой ущерб здоровью общества, экономике. Есть немало особо опасных вирусов, которые оцениваются западными стратегами как весьма эффективное средство ведения биологической войны.

1 История вирусологии, природа и происхождение вирусов

1.1 Открытие вирусов

Чсть открытия вирусов принадлежит русскому ученому Д. И. Ивановскому, который впервые в 1892 г. доказал существование нового типа возбудителя болезней на примере мозаичной болезни табака. Будучи студентом Петербургского университета, он выезжал на Украину и в Бессарабию для изучения причин болезни табака, а затем, после окончания университета, продолжал исследования в Никитском ботаническом саду под Ялтой. В содержимом пораженного листа он не обнаружил бактерий, однако сок больного растения вызывал поражения здоровых листьев. Д. И. Ивановский профильтровал сок больного растения через свечу Шамберлана, поры которой задерживали мельчайшие бактерии. В результате он обнаружил, что возбудитель проходит даже через такие поры, так как фильтрат продолжал вызывать заболевание листьев табака. Культивирование его на искусственных питательных средах оказалось невозможным. Д. И. Ивановский приходит к выводу, что возбудитель имеет необычную природу: он фильтруется через бактериальные фильтры, и не способен расти на искусственных питательных средах. Он назвал новый тип возбудителя «фильтрующиеся бактерии» (рисунок 1).



А – Электронная микрофотография после косоного напыления углеродом и платиной; 65 000 ×. (Фото Н. Frank.) Б – Модель. (Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart, Thieme, 1980.)

Рисунок 1 – Вирус табачной мозаики

Опыты Д. И. Ивановского в 1898 г. повторил голландский ученый М. В. Бейеринк, придя, однако, к выводу, что возбудитель табачной мозаики – жидкий живой контагий. Д.И. Ивановский с этим выводом не согласился. К этому времени были опубликованы работы Ф. Леффлера и П. Фроша, показавших, что возбудитель ящура также проходит через бактериальные фильтры. Д. И. Ивановский, анализируя эти данные, пришел к выводу, что агенты ящура и табачной мозаики принципиально сходны. В споре с М. В. Бейеринком прав оказался Д. И. Ивановский. Опыты Д. И. Ивановского были поло-

жены в основу его диссертации «О двух болезнях табака», представленной в 1888 г., и изложены в книге того же названия, вышедшей в 1892 г. Этот год и считается годом открытия вирусов. Д.И. Ивановский открыл вирус растений. Ф. Леффлер и П. Фрош открыли вирус, поражающий животных. Наконец, в 1917 г. Ф. д'Эррель открыл бактериофаг – вирус, поражающий бактерии. Таким образом, вирусы вызывают болезни растений, животных, бактерий.

Слово «вирус» означает яд, оно применялось еще Л. Пастером для обозначения заразного начала. Позже стали применять название «ультравироз» или «фильтрующий вирус», затем определение отбросили, и укоренился термин «вирус».

Особенно бурное развитие получили вирусология, микробиология и иммунология в 50-60-е годы нашего столетия. Этому способствовали следующие причины:

- важнейшие открытия в области молекулярной биологии, генетики, биоорганической химии;
- появление таких новых наук, как генетическая инженерия, биотехнология, информатика;
- создание новых методов и научной аппаратуры, позволяющих глубже проникать в тайны живой природы.

Таким образом, с 50-х годов в развитии вирусологии и иммунологии начался молекулярно-генетический период, который характеризуется рядом принципиально важных научных достижений и открытий. К ним относятся:

- 1) расшифровка молекулярной структуры и молекулярно-биологической организации многих вирусов и бактерий; открытие простейших форм жизни инфекционного белка (приона);
- 2) расшифровка химического строения и химический синтез некоторых антигенов. Например, химический синтез лизоцима, пептидов вируса СПИ-Да;
- 3) расшифровка строения антител-иммуноглобулинов;
- 4) разработка метода культур животных и растительных клеток и их выращивания в промышленных масштабах с целью получения вирусных антигенов;
- 5) получение рекомбинантных бактерий и рекомбинантных вирусов. Синтез отдельных генов вирусов и бактерий. Получение рекомбинантных штаммов бактерий и вирусов, сочетающих свойства родительских особей или приобретающих новые свойства;
- 6) создание гибридом путем слияния иммунных В-лимфоцитов. продуцентов антител и раковых клеток с целью получения моноклональных антител;
- 7) открытие иммуномодуляторов, иммуноцитоккинов (интерлейкины, интерфероны, миелопептиды и др.), эндогенных природных регуляторов иммунной системы и их использование для профилактики и лечения различных болезней;
- 8) получение вакцин (вакцина гепатита В, малярии, антигенов ВИЧ и других антигенов), биологически активных пептидов (интерфероны, интер-

лейкины, ростовые факторы и др.) с помощью методов биотехнологии и приемов генетической инженерии;

9) разработка синтетических вакцин на основе природных или синтетических антигенов и их фрагментов, а также искусственного носителя адьюванта (помощника), стимулятора иммунитета;

10) изучение врожденных и приобретенных иммунодефицитов, их роли в иммунопатологии и разработка иммунокорректирующей терапии. Открытие вирусов, вызывающих иммунодефициты;

11) разработка принципиально новых способов диагностики инфекционных и неинфекционных болезней (иммуноферментный, радиоиммунный анализы, иммуноблоттинг, гибридизация нуклеиновых кислот). Создание на основе этих способов тест-систем для индикации, идентификации микроорганизмов, диагностики инфекционных и неинфекционных болезней (опухоли, сердечно-сосудистые, аутоиммунные, эндокринные и др.), а также выявления нарушений при некоторых состояниях (беременность, переливание крови, пересадка органов и т.д.).

Выше нами перечислены только наиболее крупные достижения молекулярно-генетического периода в развитии микробиологии вирусологии и иммунологии. За это время был открыт ряд новых вирусов (возбудители геморрагических лихорадок Ласса, Мачупо; вирус, вызывающий СПИД) и бактерий (возбудитель болезни легионеров); созданы новые вакцинные и другие профилактические препараты (вакцины против кори, полиомиелита, паротита, клещевого энцефалита, вирусного гепатита В, полианатоксины против столбняка, газовой гангрены и ботулизма и др.), новые диагностические препараты.

Большой вклад в развитие микробиологии и иммунологии в этот период внесли зарубежные (Ф. Вернет, Д. Солк, А. Сэбин, Д. Села, Г. Эдельман, Р. Портер, Д. Келер, Ц. Милытейн, Н. Ерне, С. Тонегава и др.) и отечественные (А. А. Смородинцев, В. Д. Тимаков, П. Ф. Здродовский, Л. А. Зильбер, В. М. Жданов, Г. В. Выгодчиков, З. В. Ермольева, М. П. Чумаков, Р. В. Петров, П. Н. Косяков и др.) ученые.

В Российской Федерации существует разветвленная сеть научно-исследовательских институтов и предприятий по производству диагностических, профилактических и лечебных препаратов. В системе РАМН и других ведомств функционируют крупные научно-исследовательские институты: эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, вирусологии им. Д. И. Ивановского, полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова, вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, вирусных препаратов и др.

1.2 Периоды развития вирусологии

Быстрый прогресс в области вирусологических знаний, основанный в значительной мере на достижениях смежных естественных наук, обусловил возможность углубленного познания природы вирусов. Как ни в одной дру-

гой науке, в вирусологии прослеживается быстрая и четкая смена уровней познания – от уровня организма до субмолекулярного.

Приведенные периоды развития вирусологии отражают те уровни, которые являлись доминирующими в течение одного – двух десятилетий.

Уровень организма (30-40-е годы XX века). Основной экспериментальной моделью являются лабораторные животные (белые мыши, крысы, кролики, хомяки и т. д.), основным модельным вирусом – вирус гриппа. В 40-е годы в вирусологию в качестве экспериментальной модели прочно входят куриные эмбрионы в связи с их высокой чувствительностью к вирусам гриппа, оспы и некоторым другим. Использование этой модели стало возможным благодаря исследованиям австралийского вирусолога и иммунолога Ф.М. Бернета, автора пособия по вирусологии «Вирус, как организм».

Открытие в 1941 г. американским вирусологом Херстом феномена геммагглютинации немало способствовало изучению взаимодействия вируса с клеткой на модели вируса гриппа и эритроцитов.

Большим вкладом отечественных вирусологов в медицинскую вирусологию явилось изучение природно-очаговых заболеваний – эпидемических энцефалитов. В 1937 г. была организована первая экспедиция, возглавляемая Л. А. Зильбером, в составе которой были Е. Н. Левкович, А. К. Шубладзе, М. П. Чумаков, В. Д. Соловьев и др. Благодаря проведенным исследованиям был открыт вирус клещевого энцефалита, выявлены его переносчики – иксодовые клещи, разработаны методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения. Советскими вирусологами были изучены вирусные геморрагические лихорадки, разработаны препараты для диагностических и лечебно-профилактических целей.

Уровень клетки (50-е годы). В 1949 г. происходит значительное событие в истории вирусологии – открытие возможности культивировать клетки в искусственных условиях. В 1952 г. Дж. Эндерс, Т. Уэллер, Ф. Роббинс получили Нобелевскую премию за разработку метода культуры клеток. Использование культуры клеток в вирусологии явилось подлинно революционным событием, послужившим основой для выделения многочисленных новых вирусов, их идентификации, клонирования, изучения их взаимодействия с клеткой. Появилась возможность получения культуральных вакцин. Эта возможность была доказана на примере вакцины против полиомиелита. В содружестве с американскими вирусологами Дж. Солком и А. Сейбином, советскими вирусологами М. П. Чумаковым, А. А. Смородинцевым и др. была разработана технология производства, апробирована и внедрена в практику убитая и живая вакцины против полиомиелита. В 1959 г. была проведена массовая иммунизация детского населения в СССР (около 15 млн.) живой полиомиелитной вакциной, в результате резко снизилась заболеваемость полиомиелитом и практически исчезли паралитические формы заболевания. В 1963 г. за разработку и внедрение в практику живой полиомиелитной вакцины М. П. Чумакову и А. А. Смородинцеву была присуждена Ленинская премия. Другим важным приложением техники выращивания вирусов явилось получение Дж. Эндерсом и А. А. Смородинцевым живой коревой вакцины,

широкое применение которой обусловило значительное снижение заболеваемости корью и является основой для искоренения этой инфекции.

Широко внедрялись в практику и другие культуральные вакцины – энцефалитная, ящурная, антирабическая и т. д.

Молекулярный уровень (60-е годы). В вирусологии широко стали использовать методы молекулярной биологии, а вирусы благодаря простой организации их генома стали распространенной моделью для молекулярной биологии. Ни одно открытие молекулярной биологии не обходится без вирусной модели, включая генетический код, весь механизм внутриклеточной экспрессии генома, репликацию ДНК, процессинг (созревание) информационных РНК и т. д. В свою очередь использование молекулярных методов в вирусологии позволило установить принципы строения (архитектуры) вирусных индивидуумов – вирионов (термин, введенный французским микробиологом А. Львовом), способы проникновения вирусов в клетку и их репродукции.

Субмолекулярный уровень (70-е годы). Стремительное развитие молекулярной биологии открывает возможности изучения первичной структуры нуклеиновых кислот и белков. Появляются методы секвенирования ДНК, определения аминокислотных последовательностей белка. Получают первые генетические карты геномов ДНК-содержащих вирусов.

В 1970 г. Д. Балтимором и одновременно Г. Теминым и С. Мизутани была открыта обратная транскриптаза в составе РНК-содержащих онкогенных вирусов, фермент, переписывающий РНК на ДНК. Становится реальным синтез гена с помощью этого фермента на матрице, выделенной из полисом и РНК. Появляется возможность переписать РНК в ДНК и провести ее секвенирование.

В 1972 г. возникает новый раздел молекулярной биологии – генная инженерия. В этом году публикуется сообщение П. Берга в США о создании рекомбинантной молекулы ДНК, которое положило начало эре генной инженерии. Появляется возможность получения большого количества нуклеиновых кислот и белков путем введения рекомбинантных ДНК в состав генома прокариот и простых эукариот. Одним из основных практических приложений нового метода является получение дешевых препаратов белков, имеющих значение в медицине (инсулин, интерферон) и сельском хозяйстве (дешевые белковые корма для скота).

Этот период характеризуется важными открытиями в области медицинской вирусологии. В фокусе изучения – три наиболее массовых болезни, наносящих огромный ущерб здоровью людей и народному хозяйству – грипп, рак, гепатит.

Установлены причины регулярно повторяющихся пандемий гриппа. Детально изучены вирусы рака животных (птиц, грызунов), установлена структура их генома и идентифицирован ген, ответственный за злокачественную трансформацию клеток – онкоген. Установлено, что причиной гепатитов А и В являются разные вирусы: гепатит А вызывает РНК-содержащий вирус, отнесенный к семейству пикорнавирусов, а гепатит В – ДНК-

содержащий вирус, отнесенный к семейству гепаднавирусов. В 1976 г. Г. Бламберг, исследуя антигены крови у аборигенов Австралии, обнаружил так называемый австралийский антиген, который он принял за один из антигенов крови. Позже было выявлено, что этот антиген является антигеном гепатита В, носительство которого распространено во всех странах мира. За открытие австралийского антигена Г. Бламбергу в 1976 г. была присуждена Нобелевская премия.

Другая Нобелевская премия в 1976 г. присуждена американскому ученому К. Гайдушеку, который установил вирусную этиологию, одной из медленных инфекций человека – куру, наблюдающейся в одном из туземных племен на острове Новая Гвинея и связанной с ритуальным обрядом – поеданием зараженного мозга умерших родственников. Благодаря усилиям К. Гайдушека, поселившегося на острове Новая Гвинея, эта традиция была искоренена и число больных резко сократилось.

1.3 Природа вирусов

Со времени открытия вирусов по настоящее время представления о природе вирусов претерпели значительные изменения.

Д. И. Ивановский и другие исследователи того времени подчеркивали два свойства вирусов, позволившие выделить их из общей массы микроорганизмов: фильтруемость и неспособность размножаться на всех искусственных питательных средах. Позже выяснилось, что эти свойства не абсолютны, так как были обнаружены фильтрующиеся (L) формы бактерий и микоплазмы, растущие на искусственных питательных средах, по размерам приближающиеся к наиболее крупным вирусам (вирусы оспы человека и животных).

Внутриклеточный паразитизм вирусов также оказался не абсолютным критерием, отграничивающим их от остальных микроорганизмов. Внутриклеточными паразитами являются не только вирусы, но и некоторые бактерии (гонококки, менингококки) и простейшие (малярийный плазмодий). С развитием знаний о вирусах были найдены более надежные критерии, например существование у вирусов только одной из двух нуклеиновых кислот, в то время как у всех других микроорганизмов имеются обе нуклеиновые кислоты – дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК).

Другим уникальным свойством вирусов является отсутствие у них собственных белоксинтезирующих систем. Синтез вирусных белков осуществляется белоксинтезирующим аппаратом клетки – клеточными рибосомами, которые связываются с вирусными иРНК. Вирусы вводят в клетку лишь свою генетическую информацию, которая успешно конкурирует с клеточной информацией, несмотря на ничтожно малые размеры вирусных геномов (на 5 – 6 порядков меньших по молекулярным массам, чем геном эукариотической клетки). Поэтому и уровень паразитизма у вирусов иной, чем у бактерий или простейших: в отличие от внутриклеточного паразитизма последних паразитизм вирусов определяется как генетический паразитизм, а вирусы рассмат-

риваются как генетические паразиты. Ярким примером генетического паразитизма является способность ряда вирусов интегрировать (объединяться) с клеточным геномом. В этом случае вирусные гены превращаются в группу клеточных генов и обозначаются как провирус. Стадия интеграции, помимо умеренных ДНК-содержащих фагов, характерна для онкогенных ДНК-содержащих вирусов и вируса гепатита В. Эта стадия обязательна для большой группы РНК-содержащих вирусов – ретровирусов.

Однако и в том случае, когда интеграции не происходит и вирусный геном находится в автономном состоянии, возникновение инфекции обусловлено конкуренцией вирусного и клеточного геномов.

К уникальным свойствам вируса относится его способ размножения, который резко отличается от способов размножения всех других клеток и организмов (бинарное деление, почкование, образование спор). Вирусы не растут, а их размножение обозначается как дисъюнктивная (разобшенная) репродукция, что подчеркивает разобщенность в пространстве (на территории клетки) и времени синтеза вирусных компонентов (нуклеиновых кислот и белков) с последующей сборкой и формированием вирионов.

В связи с вышеизложенным не раз возникали дискуссии по поводу того, что же такое вирусы – живое или не живое, организмы или не организмы. Безусловно, вирусы обладают основными свойствами всех других форм жизни – способностью размножаться, наследственностью, изменчивостью, приспособляемостью к условиям внешней среды; они занимают определенную экологическую нишу, на них распространяются законы эволюции органического мира на земле. Поэтому к середине 40-х годов сложилось представление о вирусах как о наиболее простых микроорганизмах. Логическим развитием этих взглядов было введение термина «вирион», обозначающего внеклеточный вирусный индивидуум. Однако с развитием исследований по молекулярной биологии вирусов стали накапливаться факты, противоречащие представлению о вирусах как организмах.

Отсутствие собственных белоксинтезирующих систем, дисъюнктивный способ репродукции, интеграция с клеточным геномом, существование вирусов сателлитов и дефектных вирусов, феноменов множественной реактивации и комплементации – все это мало укладывается в представление о вирусах как организмах. Представление это еще более теряет смысл, когда мы обратимся к вирусоподобным структурам – плазмидам, вириоидам и агентам типа возбудителя скрепи.

Плазмиды (другие названия – эписомы, эпивирусы) представляют двунитчатые кольцевые ДНК с молекулярной массой в несколько миллионов, реплицируемые клеткой. Они вначале были обнаружены у прокариотов, и с их существованием связаны разные свойства бактерий, например устойчивость к антибиотикам. Поскольку плазмиды обычно не связаны с бактериальной хромосомой (хотя многие из них способны к интеграции), их считают экстрахромосомными факторами наследственности.

Плазмиды были обнаружены и у эукариотов (дрожжей и других грибов), более того, обычные вирусы высших животных также могут существо-

вать в виде плазмид, т.е. кольцевых ДНК, лишенных собственных белков и реплицируемых клеточными ферментами синтеза ДНК. В частности, в виде плазмид могут существовать вирусы папилломы коров, обезьяний вирус 40 (SV40). При персистенции вируса герпеса в культуре клеток могут образовываться плазмиды – кольцевые ДНК, составляющие лишь часть генома этого вируса.

К вирусам примыкают вириды – агенты, открытые Т. О. Дайнером в 1972 г., вызывающие заболевания некоторых растений и способные передаваться как обычные инфекционные вирусы. При их изучении оказалось, что это сравнительно небольшие по размерам молекулы кольцевой суперспирализованной РНК, состоящие из немногих, 300 – 400 нуклеотидов. Механизм репликации виридов не вполне ясен.

Наконец, следует упомянуть об агенте скрепи - возбудителе подострой трансмиссивной губкообразной энцефалопатии овец. Вероятно, сходные агенты вызывают и другие формы губкообразных энцефалопатии животных и человека, в основе которых лежит прогрессирующее разрушение нервных клеток, в результате чего мозг приобретает губчатую (спонгиозную) структуру. Агент скрепи имеет белковую природу и даже получил специальное название — прион (от слов proteinaceous infectious particle — белковая инфекционная частица). Предполагается, что этот белок является одновременно и индуктором и продуктом какого-то клеточного гена, ставшего автономным и ускользнувшего от регуляции («взбесившийся ген»).

Все вирусы, включая сателлиты и дефектные вирусы, плазмиды, вириды и даже агенты скрепи (их гены), имеют нечто общее, их объединяющее. Все они являются автономными генетическими структурами, способными функционировать и репродуцироваться в восприимчивых к ним клетках животных, растений, простейших, грибов, бактерий. По-видимому, это наиболее общее определение, позволяющее очертить царство вирусов. На основании сформулированного определения вирусы, не будучи организмами, тем не менее, являются своеобразной формой жизни и поэтому подчиняются законам эволюции органического мира на земле.

1.4 Происхождение вирусов

По вопросу о происхождении вирусов высказывались разные предположения. Одни авторы считали, что вирусы являются результатом крайнего проявления регрессивной эволюции бактерий или других одноклеточных организмов. Гипотеза регрессивной эволюции не может объяснить разнообразия генетического материала у вирусов, неклеточной их организации, дисъюнктивного способа репродукции и отсутствия белоксинтезирующих систем. Поэтому в настоящее время эта гипотеза имеет скорее историческое значение и не разделяется большинством вирусологов.

Согласно второй гипотезе вирусы являются потомками древних, доклеточных форм жизни – протобионтов, предшествовавших появлению клеточных форм жизни, с которых и началась биологическая эволюция. Эта гипоте-

за также не разделяется в настоящее время большинством вирусологов, так как она не объясняет тех же вопросов, разрешить которые оказалась бессильной первая гипотеза.

Третья гипотеза предполагает, что вирусы произошли от генетических элементов клеток, ставших автономными, хотя не ясно, какие из этих элементов дали начало столь большому разнообразию генетического материала у вирусов. Эта гипотеза, которую иронически назвали гипотезой «взбесившихся генов», находит наибольшее число сторонников, однако не в том первоначальном виде, в каком она была высказана, так как и она не объясняет наличие у вирусов форм генетического материала (однонитчатая ДНК, дву-нитчатая РНК), отсутствующих в клетках, образование капсида, существование двух форм симметрии и т.п.

Вероятно, вирусы действительно являются дериватами генетических элементов клеток, но они возникали и эволюционировали вместе с возникновением и эволюцией клеточных форм жизни. Природа как бы испробовала на вирусах все возможные формы генетического материала (разные виды РНК и ДНК), прежде чем окончательно остановила свой выбор на канонической его форме – двунитчатой ДНК, общей для всех клеточных форм организмов, начиная от бактерии и кончая человеком. Будучи, с одной стороны, автономными генетическими структурами, с другой стороны, неспособными развиваться вне клеток, вирусы на протяжении миллиардов лет биологической эволюции проделали настолько разнообразные пути развития, что отдельные их группы не имеют преемственной связи между собой. По-видимому, разные группы вирусов возникали в исторически разные времена из разных генетических элементов клеток и поэтому существующие в настоящее время разные группы вирусов имеют полифилетическое происхождение, т.е. не имеют единого общего предка. Тем не менее, универсальность генетического кода распространяется и на вирусы, свидетельствуя тем самым, что и они являются порождением органического мира земли.

1.5 Роль вирусов в эволюции

Вирусы обычно рассматриваются как паразиты – возбудители инфекционных болезней, наносящих вред человеку, животным, растениям. Однако такой подход нельзя признать правильным. Была высказана, согласно которой вирусы являются важным фактором эволюции органического мира. Преодолевая видовые барьеры, вирусы могут переносить отдельные гены или группы генов, а интеграция вирусной ДНК с хромосомами клеток может приводить к тому, что вирусные гены становятся клеточными генами, выполняющими важные функции.

Поскольку вирусы, будучи особыми формами жизни, не являются микроорганизмами, то и вирусология является не разделом микробиологии, а самостоятельной научной дисциплиной, имеющей свой объект изучения и свои методы исследования.

2 Химический состав вирусов

Просто организованные вирусы представляют собой нуклеопротеиды или нуклеокапсиды и состоят из нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и нескольких кодируемых ею белков, формирующих вирусную оболочку вокруг нуклеиновой кислоты – капсид.

Сложно организованные вирусы содержат дополнительные оболочки, белковые или липопротеидные, и имеют более сложный химический состав. Помимо нуклеиновой кислоты и белков, они содержат липиды в наружных оболочках и углеводы в составе белков наружных оболочек (гликопротеидов). Обычно липиды и углеводы имеют клеточное происхождение. В составе некоторых вирусов обнаруживаются также клеточные нуклеиновые кислоты и белки.

Клетки всех живых организмов содержат два вида нуклеиновой кислоты – ДНК и РНК (таблицы 1, 2). ДНК представляет собой двунитчатую молекулу, а РНК – однонитчатую. Двунитчатая ДНК – это клеточный геном, выполняющий функции хранения и репликации наследственной информации. Однонитчатая РНК представлена 3 классами молекул:

- 1) информационные РНК (иРНК), образующиеся в результате транскрипции генома и передающие заложенную в геноме информацию на белоксинтезирующий аппарат клетки;
- 2) рибосомальные РНК, являющиеся структурным элементом рибосомы;
- 3) тРНК, доставляющие аминокислоты к белоксинтезирующему аппарату.

В отличие от клеток вирусы содержат лишь один вид нуклеиновой кислоты – либо РНК, либо ДНК. И та, и другая может быть хранителем наследственной информации, выполняя, таким образом, функции генома.

Вирусные нуклеиновые кислоты характеризуются поразительным разнообразием форм. Вирусный геном может быть представлен как однонитчатыми, так и двунитчатыми молекулами РНК и ДНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой (таблица 1), РНК – как непрерывной, так и фрагментированной и кольцевой молекулой (таблица 2, рисунок 2).

Вирусные ДНК

Молекулярная масса вирусных ДНК варьирует в широких пределах от $1 \cdot 10^6$ до $250 \cdot 10^6$. Самые большие вирусные геномы содержат несколько сотен генов, а самые маленькие содержат информацию, достаточную для синтеза лишь нескольких белков.

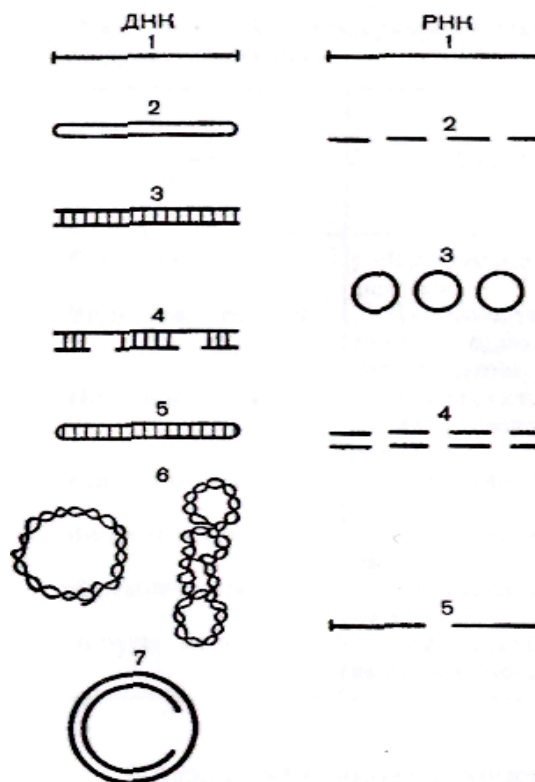
В геномах, представленных двунитчатыми ДНК, информация обычно закодирована на обеих нитях ДНК. Это свидетельствует о максимальной экономии генетического материала у вирусов, что является неотъемлемым свойством их как генетических паразитов. В связи с этим оценка генетической информации не может быть проведена по молекулярной массе молекул.

Хотя в основном структура ДНК уникальна, т. е. большинство нуклеотидных последовательностей встречаются лишь по одному разу, однако на

концах молекул имеются повторы, когда в концевом фрагменте линейной ДНК повторяется ее начальный участок. Повторы могут быть прямыми и инвертированными.

Таблица 1 – Типы молекул вирусных ДНК

Вирусы	Тип ДНК
Парвовирусы	Линейная одно нитчатая
φX174 и другие фаги	Кольцевая однострчатая
Аденовирусы, вирусы герпеса фаг Т7 и другие фаги	Линейная двунитчатая
Фаг Т5	Линейная двунитчатая с разрывами в одной цепи
Вирусы оспы	Двунитчатая с замкнутыми концами
Паповавирусы, фаг RM2, вирус мозаики цветной капусты	Двунитчатая кольцевая со сверхвитками или без них
Вирус гепатита В	Двунитчатая кольцевая с однострчатым участком



ДНК: 1 - парвовирусов; 2 - фага ХІТ4; 3 - аденовирусов; вирусов герпеса; 4 - фага Т5; 5 - вирусов оспы; 6 - паповавирусов; 7 - вируса гепатита В.
 РНК: 1 - пикорнавирусов, тогавирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов; 2 - ортомиксовирусов, аренавирусов; 3 - буньявирусов; 4 - реовирусов; 5 - ретровирусов.

Рисунок 2 – Типы молекул вирусных ДНК и РНК

Таблица 2 – Типы молекул вирусных РНК

Вирусы	Тип РНК
Пикорнавирусы, тогавирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы	Линейная однонитчатая
Ортомиксовирусы, аренавирусы, вирус мозаики, костра	Фрагментированная однонитчатая
Буньявирусы	Фрагментированная однонитчатая кольцевая
Реовирусы, вирус раневых опухолей растений, вирус цитоплазматического полнэдроза насекомых	Фрагментированная двунитчатая
Ретровирусы	Линейная однонитчатая, диплоидный геном

Способность к приобретению кольцевой формы, которая потенциально-заложена в концевых прямых и, инвертированных повторах, имеет большое значение для вирусов. Кольцевая форма обеспечивает устойчивость ДНК к экзонуклеазам. Стадия образования кольцевой формы обязательна для процесса интеграции ДНК с клеточным геномом. Наконец, кольцевые формы представляют собой удобный и эффективный способ регуляции транскрипции и репликации ДНК.

В составе вирионов, содержащих однонитчатую ДНК, обычно содержатся молекулы ДНК одной полярности. Исключение составляют аденоассоциированные вирусы, вирионы которых содержат ДНК либо одной полярности (условно называемой «плюс»), либо ДНК с противоположным знаком (условно - «минус»). Поэтому тотальный препарат вируса состоит из двух типов частиц, содержащих по одной молекуле «плюс» - ДНК или «минус» - ДНК.

Инфекционный процесс при заражении этими вирусами возникает лишь при проникновении в клетку частиц обоих типов.

Вирусные РНК

Из нескольких сотен известных в настоящее время вирусов человека и животных РНК-геном содержит около 80 % вирусов. Способность РНК хранить наследственную информацию является уникальной особенностью вируса.

У просто организованных и некоторых сложно организованных вирусов вирусная РНК в отсутствие белка может вызвать, инфекционный процесс. Впервые инфекционная активность РНК вируса табачной мозаики была продемонстрирована Х. Френкель-Конратом и соавт. в 1957 г. и А. Гирером и Г. Шраммом в 1958 г. Впоследствии положение об инфекционной активности РНК было перенесено на все РНК-содержащие вирусы, однако долгие усилия доказать это для таких вирусов, как вирусы гриппа, парамиксовирусы, рабдовирусы (так называемые минус-нитевые вирусы), оказались бесплодными: у этих вирусов инфекционной структурой являются не РНК, а

комплекс РНК с внутренними белками. Таким образом, геномная РНК может обладать инфекционной активностью в зависимости от своей структуры.

Структура вирусных РНК чрезвычайно разнообразна. У вирусов обнаружены однонитчатые и двунитчатые, линейные, фрагментированные и кольцевые РНК (таблица 2). РНК-геном в основном является гаплоидным, до геном ретровирусов – диплоидный, т.е. состоит из двух идентичных молекул РНК.

Однонитчатые РНК. Молекулы однонитчатых вирусных РНК существуют в форме одиночной полинуклеотидной цепи со спирализованными ДНК-подобными участками. При этом не комплементарные нуклеотиды, разделяющие комплементарные участки, могут выводиться из состава спирализованных участков в форме различных «петель» и «выступов» (рисунок 3). Суммарный процент спирализации вирусных РНК не обнаруживает, каких-либо особенностей по сравнению с таковыми у клеточных РНК.

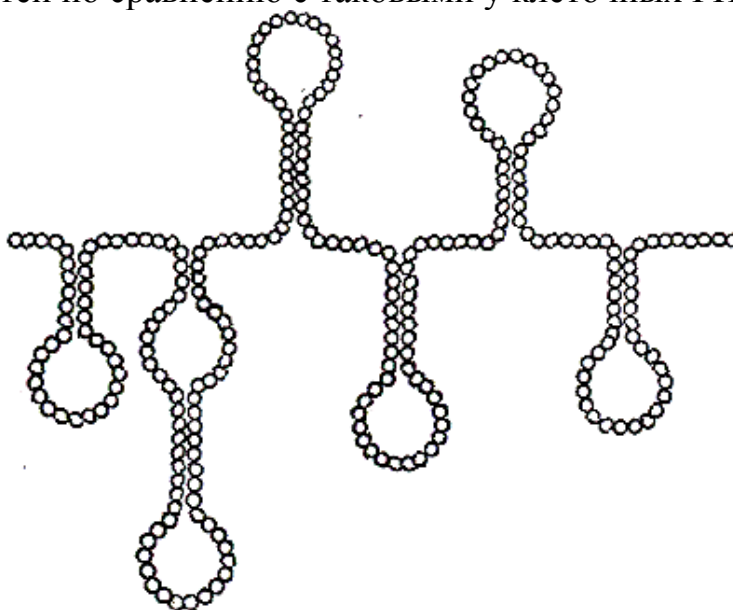


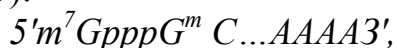
Рисунок 3 – Вторичная структура вирусных РНК (схема)

Вирусы, содержащие однонитчатые РНК, делятся на две группы. У вирусов первой группы вирусный геном обладает функциями информационной РНК, т.е. может непосредственно переносить закодированную в нем информацию на рибосомы. По предложению Д. Балтимора (1971). РНК со свойствами информационной условно обозначена знаком «плюс» и в связи с этим вирусы, содержащие такие РНК (пикорнавирусы, тогавирусы, коронавирусы, ретровирусы), обозначены как «плюс-нитевые» вирусы, или вирусы с позитивным геномом.

Вторая группа РНК-содержащих вирусов содержит геном в виде однонитчатой РНК, которая сама не обладает функциями иРНК. В этом случае функцию иРНК выполняет РНК, комплементарная геному. Синтез этой РНК (транскрипция) осуществляется в зараженной клетке на матрице геномной РНК с помощью вирусоспецифического фермента – транскриптазы. В составе «минус-нитевых» вирусов обязательно присутствие собственного фермен-

та, осуществляющего транскрипцию геномной РНК и синтез иРНК, так как аналога такого фермента в клетках нет. Геном этих вирусов условно обозначают как «минус»-РНК, а вирусы этой группы как «минус-нитевые» вирусы, или вирусы с негативным геномом. К этим вирусам относятся ортомиксовирусы, парамиксовирусы, буньявирусы, рабдовирусы. РНК этих вирусов не способна вызвать инфекционный процесс.

В соответствии с разными свойствами вирусных РНК между двумя группами вирусов есть и структурные различия. Поскольку РНК «плюс-нитевых» вирусов выполняет функцию иРНК, она имеет специфические структурные особенности, характерные для 5'- и 3'-концов этих РНК. 5'-Конец клеточных и вирусных РНК обычно имеет структуру так называемой шапочки (по-английски «сар»):



где m^7G представляет собой 7-метилгуанин, присоединенный через пирофосфатную связь к гуаниловому нуклеотиду, сахарный остаток которого также метилирован по второму углеродному атому. Эти модификации концов иРНК, осуществляемые после синтеза доли нуклеотидной цепи, имеют существенное значение для функции иРНК: «шапочка» нужна для специфического узнавания иРНК рибосомами, функции поли (А) менее точно определены и, по-видимому, заключаются в придании стабильности молекулам иРНК. Такими же модифицированными концами обладают геномные РНК «плюс-нитевых» вирусов. Исключение составляет 5'-конец геномной РНК вируса полиомиелита, которая не содержит «шапочку», и вместо нее имеет на 5'-конце ковалентно присоединенный к остатку урацила низкомолекулярный терминальный белок. Геномные РНК «минус-нитевых» вирусов не имеют ни «шапочки», ни поли (А); модифицированные концы характерны для иРНК этих вирусов, синтезирующихся в клетке на матрице вирионной РНК и комплементарных ей. Геномная РНК ретровирусов, хотя и является «плюс-нитевой», однако не содержит «шапочку»; эту структуру содержит гомологичная РНК, синтезируемая на матрице интегрированной провирусной ДНК.

Существуют вирусы, содержащие как «плюс-нитевые», так и «минус-нитевые» РНК гены (амбисенс-вирусы). К ним относятся аренавирусы.

В основном однонитчатые РНК являются линейными молекулами, однако РНК-фрагменты буньявирусов обнаружены в виде кольцевой формы. Кольцевая форма возникает за счет образования водородных связей между концами молекул.

Двунитчатые РНК. Этот необычный для клетки тип нуклеиновой кислоты, впервые обнаруженный у реовирусов, широко распространен среди вирусов животных, растений и бактерий. Вирусы, содержащие подобный геном, называют диплорнавирусы.

Общей особенностью диплорнавирусов является фрагментированное состояние генома. Так, геном реовирусов состоит из 10 фрагментов, ротавирусов – из 11 фрагментов.

2.1 Белки

В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез двух групп белков:

- 1) структурных, которые входят в состав вирусных частиц потомства;
- 2) неструктурных, которые обслуживают процесс внутриклеточной репродукции вируса на разных его этапах, но в состав вирусных частиц не входят.

Структурные белки. Количество структурных белков в составе вирусной частицы варьирует в широких пределах в зависимости от сложности организации вириона. Наиболее просто организованный вирус табачной мозаики содержит всего один небольшой белок с молекулярной массой $17 - 18 \times 10^3$, некоторые фаги содержат 2 – 3 белка, просто организованные вирусы животных – 3 – 4 белка. Сложно устроенные вирусы, такие как вирусы оспы, содержат более 30 структурных белков.

Структурные белки делятся на 2 группы:

- 1) капсидные белки, образующие капсид, т.е. футляр для нуклеиновой кислоты вируса (от лат. capsula – вместилище), и входящие в состав капсида геномные белки, и ферменты;
- 2) суперкапсидные белки, входящие в состав суперкапсида, т.е. наружной вирусной оболочки.

Поскольку суперкапсид называют также «пеплос» (от греч. perlos — покров, мантия), эти белки называют пепломерами.

Просто организованные вирусы, представляющие собой нуклеокапсид, содержат только капсидные белки. Сложно организованные вирусы содержат капсидные и суперкапсидные белки.

Капсидные белки. Первоначальное представление о том, что капсидные белки являются всего лишь инертной оболочкой для вирусной нуклеиновой кислоты, сложилось на основании изучения наиболее просто организованного вируса табачной мозаики, частица которого состоит из одной молекулы РНК и одного типа белка, образующего чехол для РНК. Однако такое представление неправильно. Хотя основной функцией капсидных белков является функция защиты вирусного генома от неблагоприятных воздействий внешней среды, у многих вирусов в составе капсида есть белки и с другими функциями. Поэтому термин «капсид» далеко выходит за пределы представления о нем как о футляре или чехле для вирусной нуклеиновой кислоты.

В составе капсида некоторых вирусов (пикорнавирусы, паповавирусы, аденовирусы) содержатся белки, ковалентно связанные с вирусным геномом (геномные белки). Эти белки являются терминальными, т.е. соединенными с концом вирусной нуклеиновой кислоты. Функции их неразрывно связаны с функциями генома и их регуляцией.

У ряда сложно организованных вирусов в составе капсида имеются ферменты, осуществляющие транскрипцию и репликацию вирусного генома – РНК и ДНК (РНК- и ДНК-полимеразы), а также ферменты, модифицирующие концы иРНК. Если ферменты и геномные белки представлены еди-

ничными молекулами, то капсидные белки представлены множественными молекулами. Эти белки и формируют капсидную оболочку, в которую у сложно организованных вирусов вставлены молекулы белков с другими функциями.

Основным принципом строения капсидной оболочки вирусов является принцип субъединичности, т.е. построение капсидной оболочки из субъединиц-капсомеров, образованных идентичными полипептидными цепями. Правильно построенные белковые субъединицы – капсомеры возникают благодаря способности вирусных капсидных белков к самосборке. Самосборка объясняется тем, что упорядоченная структура – капсид имеет наименьшую свободную энергию по сравнению с неупорядоченными белковыми молекулами. Сборка капсидной оболочки из субъединиц запрограммирована в первичной структуре белка и происходит самопроизвольно или при взаимодействии с нуклеиновой кислотой.

Принцип субъединичности в строении вирусного капсида является универсальным свойством капсидных белков и имеет огромное значение для вирусов. Благодаря этому свойству достигается огромная экономия генетического материала. Если бы капсидная оболочка была построена из разных белков, то на кодирование ее потребовалась бы основная часть генетической информации, заложенной в вирусном геноме. В действительности на кодирование, например, одной полипептидной цепи вируса табачной мозаики, расходуется менее 10% генома. Далее, в механизме самосборки заложена возможность контроля за полноценностью вирусных полипептидов: дефектные и чужеродные полипептидные цепи при таком способе сборки вирионов будут автоматически отбрасываться.

Описанная способность к самосборке в пробирке и в зараженной клетке характерна только для простых вирусов. Сборка сложно организованных вирусов является гораздо более сложным многоступенчатым процессом, хотя отдельные ее этапы, например формирование капсидов и нуклеокапсидов, также основаны на самосборке.

Суперкапсидные белки. Гликопротеиды. Суперкапсидные белки, или пепломеры, располагаются в липопротеидной оболочке (суперкапсиде или пеплосе) сложно устроенных вирусов. Они либо пронизывают насквозь липидный бислой как, например, гликопротеиды альфа-вирусов (вируса леса Семлики), либо не доходят до внутренней поверхности. Эти белки являются типичными внутримембранными белками и имеют много общего с клеточными мембранными белками. Как и последние, суперкапсидные белки обычно гликозилированы. Углеводные цепочки прикреплены к молекуле полипептида в определенных участках. Гликозилирование осуществляют клеточные ферменты, поэтому один и тот же вирус, продуцируемый разными видами клеток, может иметь разные – углеводные остатки: может варьировать как состав углеводов, так и длина углеводной цепочки и место прикрепления ее к полипептидному остову.

У большинства вирусов гликопротеиды формируют «шипы» на поверхности вирусной частицы, длина которых достигает 7-10 нм. Шипы пред-

ставляют собой морфологические субъединицы, построенные из нескольких молекул одного и того же белка. Вирусы гриппа имеют два типа шипов, построенных соответственно из гемагглютинина и нейраминидазы. Парамиксовирусы также имеют два типа шипов, построенных соответственно из двух гликопротеидов (HN и P), рабдовирусы имеют только один гликопротеид и, соответственно, один тип шипов, а альфа-вирусы имеют два или три гликопротеида, формирующих один тип шипов.

Гликопротеиды являются амфипатическими молекулами: они состоят из наружной, гидрофильной части, которая содержит на конце аминокислотную группу (N-конец), и погруженной в липидный бислой, гидрофобной части, которая содержит на погруженном конце гидроксильную группу (C-конец). C-концом полипептид «заякоривается» в липидном бислое. Есть, однако, и исключения из этого общего положения: нейраминидаза вируса гриппа взаимодействует с липидным бислоем не C-, а N-концом.

Основной функцией гликопротеидов является взаимодействие со специфическими рецепторами клеточной поверхности. Благодаря этим белкам осуществляется распознавание специфических клеточных рецепторов и прикрепление к ним вирусной частицы, т.е. адсорбция вируса на клетке. Поэтому гликопротеиды, выполняющие эту функцию, называют вирусными прикрепительными белками.

Другой функцией гликопротеидов является участие в слиянии вирусной и клеточной мембран, т.е. в событии, ведущем к проникновению вирусных частиц в клетку. Вирусные белки слияния ответственны за такие процессы, как гемолиз и слияние плазматических мембран соседних клеток, приводящие к образованию гигантских клеток, синцитиев и симпластов.

«Адресная функция» вирусных белков. Вирусы вызывают инфекционный процесс у относительно небольшого круга хозяев. Вирус должен «узнать» чувствительную клетку, которая сможет обеспечить продукцию полноценного вирусного потомства. Если бы вирус проникал в любую клетку, которая встретилась на его пути, это привело бы к исчезновению вирусов в результате деструкции «родительской» вирусной частицы и отсутствия вирусного потомства. В процессе эволюции у вирусов вырабатывалась, так называемая, адресная функция, т.е. поиск чувствительного хозяина среди бесконечного числа нечувствительных клеток. Эта функция реализуется путем наличия специальных белков на поверхности вирусной частицы, которые узнают специфический рецептор на поверхности чувствительной клетки.

Неструктурные белки. Неструктурные белки изучены гораздо хуже, чем структурные, поскольку их выделяют не из очищенных препаратов вирусов, а из зараженных клеток, и возникают трудности в их идентификации и очистке от клеточных белков.

К неструктурным белкам относятся:

1) предшественники вирусных белков, которые отличаются от других неструктурных белков нестабильностью в зараженной клетке в результате быстрого нарезания на структурные белки;

- 2) ферменты синтеза РНК и ДНК (РНК- и ДНК-полимеразы), обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома;
- 3) белки-регуляторы;
- 4) ферменты, модифицирующие вирусные белки, например протеиназы и протеинкиназы.

Однако многие неструктурные белки при ряде вирусных инфекций еще не идентифицированы и функции их не определены.

2.2 Липиды

Липиды обнаружены у сложно организованных вирусов и в основном находятся в составе липопротеидной оболочки (суперкапсида), формируя ее липидной бислоем, в который вставлены суперкапсидные белки.

Все сложно организованные РНК-содержащие вирусы имеют в своем составе значительное количество липидов (от 15 до 35 % от сухого веса). Из ДНК-содержащих вирусов липиды содержат вирусы оспы, герпеса и гепатита В. Примерно 50-60 % липидов в составе вирусов представлено фосфолипидами, 20-30 % составляет холестерин.

Липидный компонент стабилизирует структуру вирусной частицы. Экстракция липидов органическими растворителями, обработка вирусной частицы детергентами или липазами приводит к деградации вирусной частицы и потере инфекционной активности.

Вирусы, содержащие липопротеидную мембрану, формируются путем почкования на плазматической мембране клеток (или на мембранах эндоплазматической сети с выходом во внутриклеточные вакуоли). Поэтому липопротеидная оболочка этих вирусов представляет собой мембрану клетки-хозяина, модифицированную за счет наличия на ее наружной поверхности вирусных суперкапсидных белков. Из этого следует, что состав липидов почкующихся вирусов близок к составу липидов клетки-хозяина. К почкующимся вирусам относятся крупные рНК-содержащие вирусы: ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, тогавирусы, ретровирусы, бунья-вирусы, аренавирусы, коронавирусы.

В связи с клеточным происхождением липидов общий состав липидной фракции и содержание ее отдельных компонентов у одного и того же вируса могут существенно различаться в зависимости от клетки-хозяина, где происходила репродукция вируса. Наоборот, если разные почкующиеся вирусы репродуцировались в одних и тех же клетках, их липиды оказываются более или менее сходными.

У вирусов оспы и гепатита В липиды имеют иное происхождение, так как эти вирусы не почкуются через плазматическую мембрану. У вирусов оспы липиды не образуют дифференцированной оболочки. Обработка вируса осповакцины эфиром не приводит к потере инфекционной активности или каким-либо структурным изменениям вириона. Липиды вируса гепатита В и его НВs-антигена образуются путем инвагинации мембран эндо-

плазматической сети. Вирус герпеса формируется путем почкования через ядерную оболочку, поэтому в его составе есть липиды ядерной оболочки.

2.3 Углеводы

Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов. Количество сахаров в составе гликопротеидов может быть достаточно большим, достигая 10-13 % от массы вириона. Химическая специфичность их полностью определяется клеточными ферментами, обеспечивающими перенос и присоединение соответствующих сахарных остатков. Обычными сахарными остатками, обнаруживаемыми в вирусных белках, являются фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, нейраминная кислота, глюкозамин. Таким образом, подобно липидам, углеводный компонент определяется клеткой-хозяином, благодаря чему один и тот же вирус, выращенный в клетках разных видов, может значительно отличаться по составу сахаров в зависимости от специфичности клеточных гликозилтрансфераз.

Углеводный компонент гликопротеидов играет существенную роль в структуре и функции белка. Он является каркасом для локальных участков гликопротеида, обеспечивая сохранение конформации белковой молекулы, и обуславливает защиту молекулы от протеаз. Возможны и другие функции углеводов, пока достоверно не установленные.

Компоненты клетки-хозяина.

В составе вирионов могут находиться компоненты клетки-хозяина. К таким компонентам могут относиться белки, и даже целые клеточные структуры. Так, например, в составе ряда оболочечных вирусов может находиться белок цитоскелета актин, в составе паповавирусов содержатся клеточные гистоны. Ряд вирусов содержит клеточные ферменты, например, протеинкиназы. В составе аренавирусов обнаружены рибосомы.

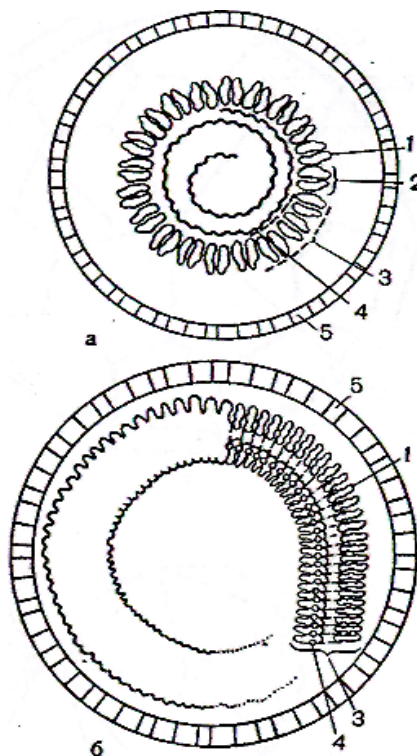
Клеточные компоненты могут включаться в вирион случайно или закономерно. В некоторых случаях они играют существенную роль в репродукции вируса, как, например, гистоны в репродукции паповавирусов.

3 Морфология, морфогенез и биофизические свойства вирусов

3.1 Архитектура вирионов

Изучение строения вирионов привело к заключению, что их формирование подчиняется строгим математическим законам построения пространственных структур – от кристаллов до архитектурных сооружений – законам, основанным на образовании структур с наименьшим уровнем свободной энергии. Поэтому понятие «структура вирионов» заменено более точным определением «архитектура вирионов», которое и укоренилось в вирусологии. Обязательным структурным элементом вирусов является капсид – белковая оболочка, окружающая вирусную нуклеиновую кислоту. Просто устроенные вирусы, такие как пикорнавирусы и парвовирусы, состоят из капсида, окружающего одну молекулу нуклеиновой кислоты. Сложно устроенные вирусы имеют еще дополнительную внешнюю оболочку – суперкапсид.

Морфологическими субъединицами капсида, видимыми в электронный микроскоп, являются капсомеры. Этот термин обычно применяют для изомерических капсидов с кубическим типом симметрии. Структурными единицами капсида являются белковые субъединицы, состоящие из одной, или нескольких молекул белка (рисунок 4). Структурная единица вируса табачной мозаики состоит из одной молекулы белка, вируса полиомиелита – из четырех молекул белка.



1-структурная единица капсида; 2-морфологическая единица капсида (капсомер); 3-капсид; 4-нуклеиновая кислота; 5-суперкапсид.

Рисунок 4 – Кубическая (а) и спиральная (б) симметрия капсидов сложно устроенных вирусов (схема)

Существуют два типа строения капсидов вирионов, которые обеспечивают образование структуры с минимумом свободной энергии. В одном случае капсомеры ассоциируются с геномом и образуют спиралевидную, винтообразную структуру. Такой тип укладки называется спиральным типом симметрии, а сама структура – нуклеокапсидом.

Такой тип симметрии нуклеокапсида характерен для вирионов табачной мозаики, ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов. Нуклеокапсиды могут быть ригидными, как, например, у парамиксовирусов, или гибкими, если межмолекулярные силы не слишком жестко связывают структурные единицы капсида, как, например, у вируса везикулярного стоматита.

В другом случае капсомеры образуют полое изометрическое тело, в центре которого находится геном и называется кубическим типом симметрии. Последнее означает, что тело является симметрическим в трех взаимно перпендикулярных направлениях (осях симметрии). Изометрические вирусные частицы с кубическим типом симметрии имеют форму геометрической фигуры икосаэдра — многогранника, состоящего обычно из 60 кратных 60 геометрически идентичных элементов, имеющих 12 вершин, 20 граней, 20 ребер. Если смотреть перпендикулярно плоскости рисунка, то ось симметрии будет окружена 5 субъединицами, в другом направлении она будет окружена тремя, а в третьем – двумя субъединицами, поэтому симметрию икосаэдра обозначают символом (5, 3, 2). По типу икосаэдра построены многие мелкие вирусы и нуклеокапсиды сложно устроенных вирусов. Например, вирион полиомиелита представляет икосаэдр, состоящий из 60 капсомеров; вирион парвовируса представляет икосаэдр, состоящий из 32 капсомеров. В зараженной клетке икосаэдры изометрических вирусов образуют кристалл или подобные скопления.

Многие сложно устроенные вирусы имеют внешнюю липопротеидную оболочку – суперкапсид, представляющую собой липидный бислой со встроенными в него суперкапсидными белками. Форма таких вирионов приближается к сферической. Суперкапсидные белки являются типичными интрамембранными белками чаще всего представлены гликопротеидами. Гликопротеиды формируют морфологические субъединицы, которые в электронном микроскопе выглядят в виде шипов. У ряда тогавирусов шипы имеют палочковидную форму; у респираторно-синцитиального вируса (семейство парамиксовирусов) – форму бутылки; у коронавирусов – форму солнечной короны; у вируса гриппа шипы, образованные гемагглютинином, имеют палочковидную форму, а шипы, образованные нейраминидазой – форму барабанной палочки.

Некоторые вирионы, содержащие спиральный нуклеокапсид имеют своеобразную форму. Так, вирусы везикулярного стоматита, бешенства и некоторых болезней рутений имеют форму винтовочной пули (рисунок 5)

Наружный и внутренний капсиды реовирусов построены по кубическому типу симметрии; оба они образуют как бы два футляра, один из которых вложен во второй. Капсомеры внутреннего капсида достигают наружно-

го капсида, благодаря чему структура вириона напоминает обод колеса. Особенно четко такая форма выражена у представителей рода ротавирусов.

При недостатке генетического материала и при избыточной продукции белков могут образоваться пустые вирусные частицы, лишенные нуклеиновой кислоты.

Весьма сложное строение имеют вирионы осповакцины. Сердцевина их, содержащая вирусную ДНК в составе нуклеопротеида, имеет форму двояковогнутого кольца и окружена двумя линзообразными латеральными кольцами. Вирус имеет несколько оболочек, из которых наиболее сложное строение имеет наружная оболочка. У ряда сложно устроенных вирусов капсид окружен дополнительными внутренними структурами, образованными обычно внутренними белками. В этом случае внутренний компонент обозначают как «сердцевина» (core), или нуклеоид.

3.2 Морфогенез вирусов

При внутриклеточной репродукции вирусов формируются структуры, отсутствующие в незараженных вирусом клетках. Эти образования – места синтеза и сборки субвирусных структур (компонентов дочерних вирионов) получили разные наименования – клеточные матриксы «фабрики», виропласты, включения. Эти структуры являются продуктами кооперативных процессов клетки и вируса, где главенствующая роль принадлежит клетке.

Морфологически матриксы выглядят по-разному у разных вирусов. Обычно это места синтеза белков, и поэтому в матриксах обнаруживаются значительные скопления рибосом (полисомы). В их состав входят также разные клеточные структуры – мембраны, микротрубочки, и т. п. При этом матриксы претерпевают определенный цикл развития. Если вначале в них преобладают полисомы, то позже являются субвирусные компоненты, которые можно выявить при использовании серологических методов исследования типа ИФ или ИЭМ, а нередко и при обычной ЭМ. При ряде инфекций матриксы связаны с мембранами эндоплазматической сети, аппаратом Гольджи и другими клеточными структурами, куда транспортируются все вирусные компоненты.

Образования, сходные с цитоплазматическими матриксами, обнаружены также в ядрах, где происходит репродукция большинства ДНК-содержащих вирусов. При окрашивании клеток они имеют вид внутриядерных включений. На поздних стадиях инфекции в матриксах или по соседству с ними накапливается большое число вирионов, часто образующих кристаллоподобные формирования. Внутриядерные кристаллоподобные включения обнаружены, например, у реовирусов, аденовирусов, паповавирусов, парвовирусов. Процесс формирования вирионов у вирусов, имеющих липопротеидные оболочки, значительно более сложен, чем у просто устроенных вирусов, и протекает многоступенчато. Так, например, изометрические нуклеокапсиды вируса герпеса формируются в ядрах и в дальнейшем транспортируются в цитоплазму путем почкования через ядерную мембрану. После это-

го вирионы транспортируются к аппарату Гольджи, проходя через мембрану эндоплазматической сети и захватывая ее, как это было при прохождении через ядерную мембрану. Поэтому внеклеточный вирус имеет две оболочки, одна из которых формируется из ядерной, вторая – из цитоплазматической мембраны.

Формирование РНП вирионов парамиксовирусов происходит в цитоплазме, где они накапливаются в виде тяжей и затем транспортируются к плазматической мембране. В это время плазматическая мембрана клетки уже модифицирована, так как в нее встроены с наружной стороны вирусные гликопротеиды, а с внутренней стороны – матриксный белок. При приближении к таким модифицированным участкам плазматической мембраны рибонуклеопротеидные тяжи свертываются в плотно упакованные клубки и, проходя через плазматическую мембрану, покрываются ею, приобретая таким путем внешнюю оболочку. Этот тип формирования вирионов называется почкованием. Почкование может происходить и во внутриклеточные вакуоли.

Морфогенез вируса оспы еще более сложен. В цитоплазме образуются сложные матриксы, в которых происходит синтез многочисленных вирусспецифических структур. Здесь же происходит и формирование вирионов, которые вначале представляют пузырьчатые образования, и лишь позже из этих предшественников формируются зрелые вирионы. Выход вирусных частиц из клетки осуществляется либо путем почкования через мембраны во внутриклеточные вакуоли, либо при разрушении клетки.

3.3 Биофизические свойства вирусов

Биофизические свойства вирусов характеризуются многими показателями – седиментацией, плотностью, вязкостью вирусных суспензий, диффузионными свойствами. Все эти характеристики относятся также к субвирусным компонентам. Наиболее важными биофизическими характеристиками вирусов являются седиментационные и плотностные свойства. Они чаще всего измеряются при исследовании вирусов.

Седиментационные свойства вирусов и субвирусных компонентов измеряют с помощью центрифугирования в аналитических и препаративных ультрацентрифугах. Коэффициент седиментации выражают в единицах Сведберга в переводе на стандартные условия при температуре 20 °С в воде и обозначают как S_{20w} .

Коэффициенты седиментации вирионов зависят от многих факторов: от их размера и массы, плотности, формы. Для определения плотности вирионов и субвирусных структур применяют равновесное центрифугирование в градиентах плотности. Для вирионов и вирусных нуклеопротеидов обычно используют градиенты плотности сахарозы и хлорида цезия.

Плотность вирионов и субвирусных структур зависит, прежде всего, от их состава. Она увеличивается с увеличением процента содержания нуклеиновых кислот и уменьшается при повышении содержания белков и липидов.

3.4 Устойчивость вирусов в окружающей среде

Разные группы вирусов обладают неодинаковой устойчивостью во внешней среде. Наименее устойчивыми являются вирусы, имеющие липопротеидные оболочки, наиболее устойчивыми – изометрические вирусы. Так, например, ортомиксовирусы и парамиксовирусы инактивируются на поверхностях в течение нескольких часов, тогда как вирусы полиомиелита, аденовирусы, реовирусы сохраняют инфекционную активность в течение нескольких дней.

Однако из этого общего правила имеются и исключения. Так, вирус оспы устойчив к высушиванию и сохраняется в экскретах в течение многих недель и месяцев. Вирус гепатита В устойчив к действию неблагоприятных внешних факторов и сохраняет свою активность в сыворотке даже при кратковременном кипячении.

Чувствительность вирусов к ультрафиолетовому и рентгеновскому облучению зависит преимущественно от размеров их генома. Поэтому, например, вирус осповакцины (молекулярная масса генома около 2×10^8) инактивируется при рентгеновском облучении около 5×10^4 рад, в то время как мелкий вирус папилломы (молекулярная масса генома 3×10^6) для инактивации требует облучения 4×10^5 рад.

Чувствительность вирусов к инактивации формальдегидом и другими химическими веществами, инактивирующими генетический материал, зависит от многих условий, среди которых следует назвать плотность упаковки нуклеиновой кислоты в белковый футляр, размеры генома, наличие или отсутствие внешних оболочек и т.п. Вирусы, имеющие липопротеидные оболочки, чувствительны к эфиру, хлороформу и детергентам, в то время как просто устроенные изометрические и палочковидные вирусы устойчивы к их действию.

Наконец, важной особенностью вирусов является чувствительность к рН. Есть вирусы, устойчивые к кислым значениям рН (2,2—3,0), например, вирусы, вызывающие кишечные инфекции и проникающие в организм алиментарным путем. Однако большинство вирусов инактивируется при кислых и щелочных значениях рН.

3.5 Классификация вирусов

Современная классификация вирусов является универсальной для вирусов позвоночных, беспозвоночных, растений и простейших. Она основана на фундаментальных свойствах вирионов, из которых ведущими являются признаки, характеризующие нуклеиновую кислоту, морфологию, стратегию генома и антигенные свойства (рисунок 5). Фундаментальные свойства поставлены на первое место, поскольку вирусы со сходными антигенными свойствами обладают и сходным типом нуклеиновой кислоты, сходными морфологическими и биофизическими свойствами.

Важным признаком для классификации, который учитывается наряду со структурными признаками, является стратегия вирусного генома, под которой понимают используемый вирусом способ репродукции, обусловленный особенностями его генетического материала. Например, полярность вирусной РНК является основным критерием для группировки вирусов и при отсутствии общих антигенных свойств.

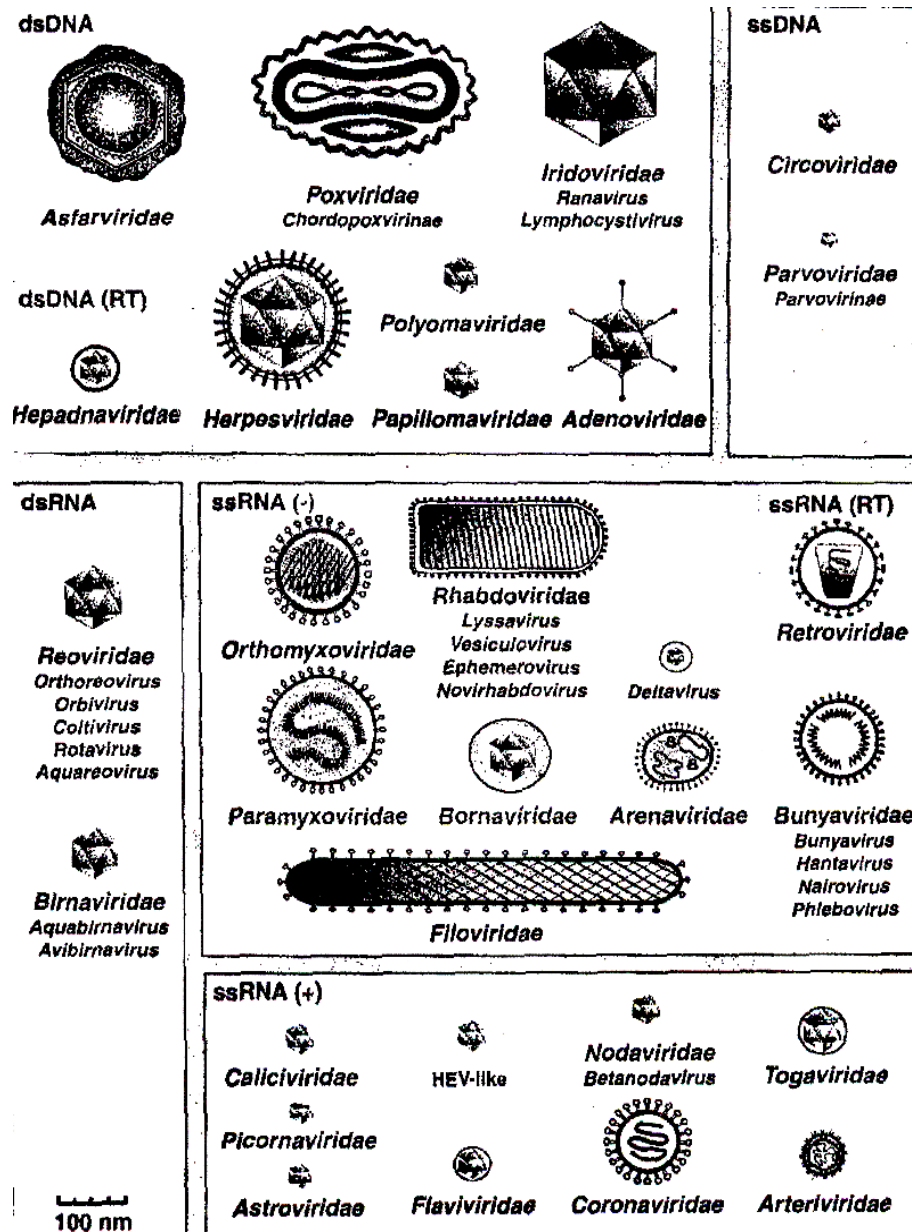


Рисунок 5 – Схематическое строение семейств вирионов, поражающих позвоночных

Антигенные и другие биологические свойства являются признаками, лежащими в основе формирования вида и имеющими значение в пределах рода.

В основу современной классификации положены следующие основные критерии:

- 1) тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), ее структура (количество нитей);
- 2) наличие липопротеидной оболочки;
- 3) стратегия вирусного генома;
- 4) размер и морфология вириона, тип симметрии, число капсомеров;
- 5) феномены генетических взаимодействий;
- 6) круг восприимчивых хозяев;
- 7) патогенность, в том числе патологические изменения в клетках и образование внутриклеточных включений;
- 8) географическое распространение;
- 9) способ передачи;
- 10) антигенные свойства.

На основании перечисленных признаков вирусы делятся на семейства, подсемейства, роды и типы. Деление на семейства произведено по критериям, изложенным в пунктах 1 и 2, деление на роды и типы – на основании нижеперечисленных признаков. Схематически строение семейств вирионов, поражающих позвоночных, приведено на рисунке 5. Дополнительно выделены еще 2 семейства: *Herpesviridae* и *Flaviviridae* (выделенные из семейства *Togaviridae*).

Современная классификация вирусов человека и животных охватывает более 4/5 всех известных вирусов, которые распределены в 19 семейств, из них 7 – ДНК-содержащих и 12 – РНК-содержащих вирусов. Некоторые допускаются привычные латинизированные обозначения, цифры при обозначении типов, сокращения, буквы и их сочетания.

3.6 Репродукция вирусов

Процесс репродукции вирусов может быть условно разделен на две фазы. Первая фаза охватывает события, которые ведут к адсорбции и проникновению вируса в клетку, освобождению его внутреннего компонента и модификации его таким образом, что он способен вызвать инфекцию. Соответственно, первая фаза включает в себя три стадии:

- 1) адсорбция вируса на клетках;
- 2) проникновение в клетки;
- 3) раздевание вируса в клетке.

Эти стадии направлены на то, чтобы вирус был доставлен в соответствующие клеточные структуры, и его внутренний компонент был освобожден от защитных оболочек. Как только эта цель достигнута, начинается вторая фаза репродукции, в течение которой происходит экспрессия вирусного генома. Эта фаза включает в себя стадии:

- 1) транскрипции,
- 2) трансляции информационных РНК,
- 3) репликации генома,

4) сборки вирусных компонентов. Заключительной стадией репродукции является выход вируса из клетки.

3.6.1 Адсорбция

Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса адсорбции, т.е. прикрепления вирусных частиц к клеточной поверхности. Процесс адсорбции возможен при наличии соответствующих рецепторов на поверхности клетки и «узнающих» их субстанций на поверхности вируса. Самые начальные процессы адсорбции имеют неспецифический характер, и в основе их может лежать электростатическое взаимодействие положительно и отрицательно заряженных группировок на поверхности вируса и клетки. Однако узнавание клеточных рецепторов вирусными белками, ведущее к прикреплению вирусной частицы к клетке, является высоко специфическим процессом. Белки на поверхности вируса, узнающие специфические группировки на плазматической мембране клетки и обуславливающие прикрепление к ним вирусной частицы, называются прикрепительными белками.

Вирусы используют рецепторы, предназначенные для прохождения в клетку необходимых для ее жизнедеятельности веществ: питательных веществ, гормонов, факторов роста и т.д. Рецепторы могут иметь разную химическую природу и представлять собой белки, углеводный компонент белков и липидов, липиды. Рецепторами для вирусов гриппа и парамиксовирусов является сиаловая кислота в составе гликопротеидов и гликолипидов (ганглиозидов), для рабдовирусов и реовирусов – также углеводный компонент в составе белков и липидов, для пикорна- и аденовирусов – белки, для некоторых вирусов – липиды. Специфические рецепторы играют роль не только в прикреплении вирусной частицы к клеточной поверхности. Они определяют дальнейшую судьбу вирусной частицы, ее внутриклеточный транспорт и доставку в определенные участки цитоплазмы и ядра, где вирус способен инициировать инфекционный процесс. Вирус может прикрепиться и к неспецифическим рецепторам и даже проникнуть в клетку, однако только прикрепление к специфическому рецептору приведет к возникновению инфекции.

Прикрепление вирусной частицы к клеточной поверхности вначале происходит путем образования единичной связи вирусной частицы с рецептором. Однако такое прикрепление непрочное, и вирусная частица может легко оторваться от клеточной поверхности (обратимая адсорбция). Для того чтобы наступила необратимая адсорбция, должны появиться множественные связи между вирусной частицей и многими молекулами рецепторов, т.е. должно произойти стабильное мультивалентное прикрепление. Количество молекул клеточных рецепторов в участках адсорбции может достигать до 3000. Стабильное связывание вирусной частицы с клеточной поверхностью в результате мультивалентного прикрепления происходит благодаря возможности свободного перемещения молекул рецепторов в липидном бислое плазматической мембраны, которое определяется подвижностью, «текучестью» белково-липидного слоя. Увеличение текучести липидов является одним из наиболее ранних событий при взаимодействии вируса с клеткой, следствием которого является формирование рецепторных полей в месте

контакта вируса с клеточной поверхностью и стабильное прикрепление вирусной частицы к возникшим группировкам – необратимая адсорбция.

Количество специфических рецепторов на поверхности клетки колеблется между 10^4 и 10^5 на одну клетку. Рецепторы ряда вирусов могут быть представлены лишь в ограниченном наборе клеток-хозяев, и этим может определяться чувствительность организма к данному вирусу. Например, пикорнавирусы адсорбируются только на клетках приматов. Рецепторы для других вирусов, напротив, широко представлены на поверхности клеток различных видов, как, например, рецепторы для ортомиксовирусов и парамиксовирусов, представляющие собой сиалилсодержащие соединения. Поэтому эти вирусы имеют относительно широкий диапазон клеток, на которых может происходить адсорбция вирусных частиц. Рецепторами для ряда тогавирусов обладают клетки исключительно широкого круга хозяев: эти вирусы могут адсорбироваться к инфицировать клетки, как позвоночных, так и беспозвоночных.

Наличие специфических рецепторов на поверхности клетки в ряде случаев обуславливает феномен зависимость от хозяина ограничения, т.е. способность вируса заражать лишь определенные виды животных. В целом ограничения при взаимодействии рецепторных систем вируса и клетки биологически оправданы и целесообразны, хотя в ряде случаев они являются «перестраховкой». Так, многие линии клеток, устойчивых к вирусам полиомиелита и Коксаки, можно заразить депротеинизированными препаратами РНК, выделенными из этих вирусов. Такое заражение клеток идет в обход естественных входных путей инфекции через взаимодействие с клеточными рецепторами. Известна потенциальная способность вирусов животных реплицироваться в протопластах дрожжей, грибов и бактерий, а бактериофагов – в клетках животных. Таким образом, вирусные ДНК и РНК обладают способностью заражать и более широкий круг хозяев, чем вирусы.

Вирусные прикрепительные белки. Прикрепительные белки могут находиться в составе уникальных органелл, таких как структуры отростка, у Т-бактериофагов или фибры у аденовирусов, которые хорошо видны в электронном микроскопе; могут формировать морфологически менее выраженные, но не менее уникальные аранжировки белковых субъединиц на поверхности вирусных мембран, как, например, шипы у оболочечных вирусов, «корону» у коронавирусов.

Просто организованные вирусы животных содержат прикрепительные белки в составе капсида. У сложно организованных вирусов эти белки входят в состав суперкапсида и представлены множественными молекулами. Например, у вируса леса Семлики (альфа-вирус) имеется 240 молекул гликопротеида в одном вирионе, у вируса гриппа – 300-450 гемагглютинирующих субъединиц, у реовируса – 24 молекулы белка, у аденовируса – 12 фибров.

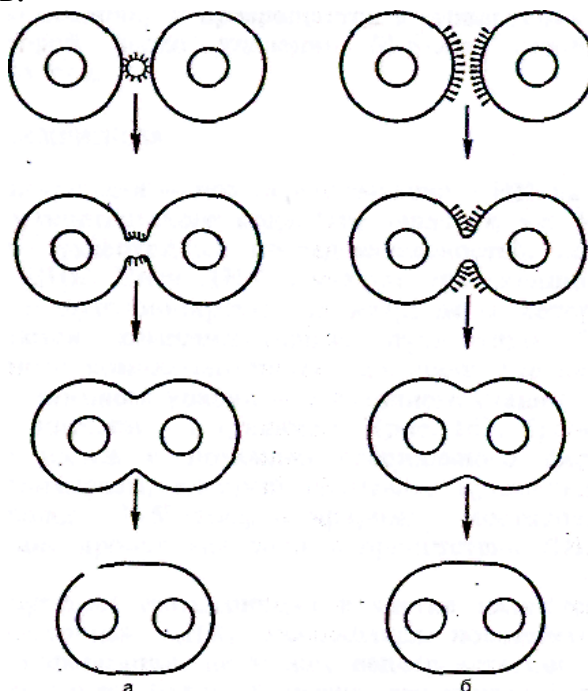
3.6.2 Проникновение вирусов в клетку

Исторически сложилось представление о двух альтернативных механизмах проникновения в клетку вирусов животных – путем виропексиса (эн-

доцитоза) и путем слияния вирусной и клеточной мембран (рисунок 6). Однако оба эти механизма не исключают, а дополняют друг друга.

Термин «виropексис», предложенный в 1948 г. Фазекасом де сан Гро, означает, что вирусная частица попадает в цитоплазму в результате инвагинации участка плазматической мембраны и образования вакуоли, которая содержит вирусную частицу.

Рецепторный эндоцитоз. Виropексис представляет собой частный случай рецепторного или адсорбционного эндоцитоза. Этот процесс является обычным механизмом, благодаря которому в клетку поступают питательные и регуляторные белки, гормоны, липопротеины и другие вещества из внеклеточной жидкости. Рецепторный эндоцитоз происходит в специализированных участках плазматической мембраны, где имеются специальные ямки, покрытые со стороны цитоплазмы особым белком с большой молекулярной массой – клатрином. На дне ямки располагаются специфические рецепторы. Ямки обеспечивают быструю инвагинацию и образование покрытых клатрином внутриклеточных вакуолей. Полупериод проникновения вещества внутрь клетки по этому механизму не превышает 10 мин с момента адсорбции. Количество образующихся в одну минуту вакуолей достигает более 2000. Таким образом, рецепторный эндоцитоз представляет собой хорошо слаженный механизм, который обеспечивает быстрое проникновение в клетку чужеродных веществ.



а – слияние извне; б – слияние изнутри.

Рисунок 6 – Слияние клеточных мембран при заражении клеток вирусом

Покрытые вакуоли сливаются с другими, более крупными цитоплазматическими вакуолями, образуя рецептосомы, содержащие рецепторы, но не содержащие клатрин, а те в свою очередь сливаются с лизосомами. Таким путем проникшие в клетку белки обычно транспортируются в лизосомы, где

происходит их распад на аминокислоты; они могут и миновать лизосомы, и накапливаться в других участках клетки в недеградированной форме. Альтернативой рецепторного эндоцитоза является жидкостный эндоцитоз, когда инвагинация происходит не в специализированных участках мембраны.

Большинство оболочечных и безоболочечных вирусов животных проникает в клетку по механизму рецепторного эндоцитоза. Эндоцитоз обеспечивает внутриклеточный транспорт вирусной частицы в составе эндоцитарной вакуоли, поскольку вакуоль может двигаться в любом направлении и сливаться с клеточными мембранами (включая ядерную мембрану), освобождая вирусную частицу в соответствующих внутриклеточных участках. Таким путем, например, ядерные вирусы попадают в ядро, а реовирусы – в лизосомы. Однако проникшие в клетку вирусные частицы находятся в составе вакуоли и отделены от цитоплазмы ее стенками. Им предстоит пройти ряд этапов, прежде чем они смогут вызвать инфекционный процесс.

Слияние вирусной и клеточной мембран. Для того чтобы внутренний компонент вируса мог пройти через клеточную мембрану, вирус использует механизм слияния мембран. У оболочечных вирусов слияние обусловлено точечным взаимодействием вирусного белка слияния с липидами клеточной мембраны, в результате которого вирусная липопротеидная оболочка интегрируется с клеточной мембраной, а внутренний компонент вируса оказывается по другую ее сторону. У безоболочечных вирусов один из поверхностных белков также взаимодействует с липидами клеточных мембран, в результате чего внутренний компонент проходит через мембрану. Большинство вирусов животных выходит в цитозол из рецептосомы.

Если при эндоцитозе вирусная частица является пассивным пассажиром, то при слиянии она становится активным участником процесса. Белком слияния является один из ее поверхностных белков. К настоящему времени этот белок идентифицирован лишь у парамиксовирусов и ортомиксовирусов. У парамиксовирусов этот белок (F-белок) представляет собой один из двух гликопротеидов, находящихся на поверхности вирусной частицы.

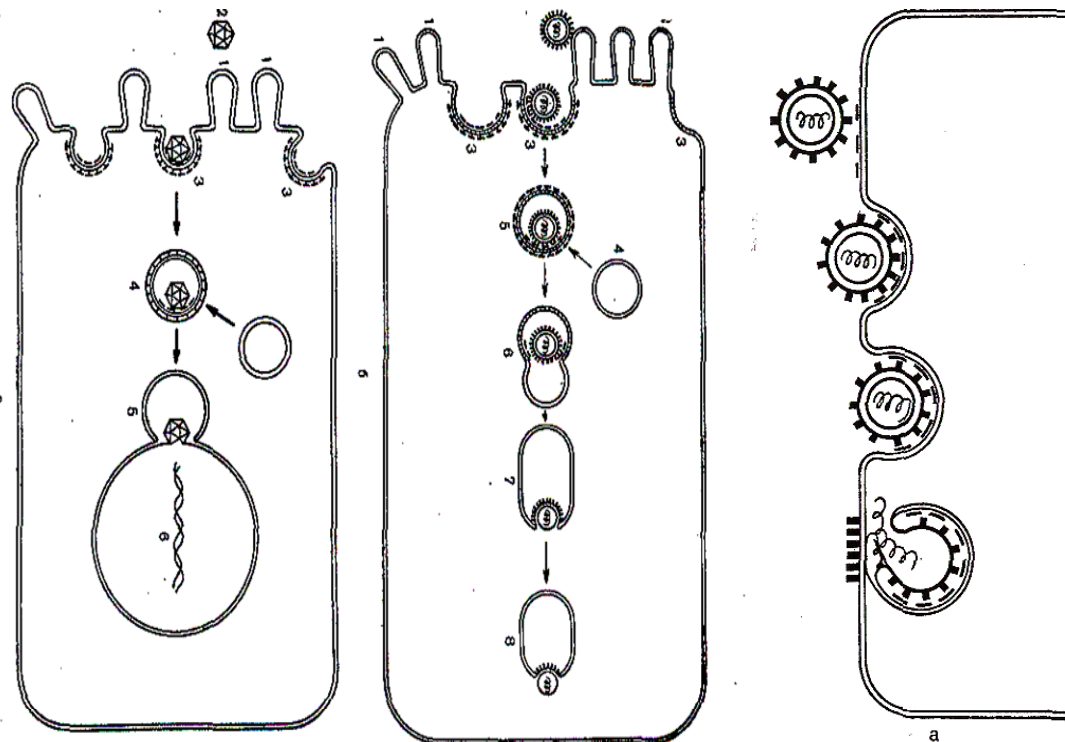
Функцию белка слияния у вируса гриппа выполняет малая гемагглютинирующая субъединица, HA2.

Парамиксовирусы вызывают слияние мембран при нейтральном pH, и внутренний компонент этих вирусов может проникать в клетку непосредственно через плазматическую мембрану. Однако большинство оболочечных и безоболочечных вирусов вызывают слияние мембран только при низком значении pH – от 5,0 до 5,75. Если к клеткам добавить слабые основания (хлорид аммония и др.), которые в эндоцитарных вакуолях повышают pH до 6,0, слияния мембран не происходит, вирусные частицы остаются в вакуолях, и инфекционный процесс не возникает. Строгая зависимость слияния мембран от значений pH обусловлена конформационными изменениями вирусных белков слияния.

В лизосоме постоянно имеется низкое значение pH (4,9). В эндоцитарной вакуоли (рецептосоме) закисление создается за счет АТФ-зависимого «протонового насоса» еще на клеточной поверхности при образовании по-

крытой вакуоли. Закисление эндоцитарной вакуоли имеет большое значение для проникающих в клетку физиологических лигандов, так как низкое значение рН способствует диссоциации лиганда от рецептора и рециркуляции рецепторов.

Схематическое изображение возможных способов проникновения вирусов в клетку показано на рисунке 7.



а – проникновение вируса путем слияния оболочки с плазматической мембраной; б – проникновение вируса в цитоплазму путем рецепторного эндоцитоза; 1 – клеточные ворсинки; 2 – внеклеточный вирион; 3 – адсорбция вируса на рецепторах покрытой ямки; 4 – покрытая вакуоль; 5 – образование рецептосомы и ее слияние с наружной ядерной оболочкой; 6 – высвободившаяся вирусная ДНК. в – проникновение вируса в ядро посредством рецепторного эндоцитоза; 1 – клеточные ворсинки; 2 – внеклеточный вирион; 3 – адсорбция вируса на рецепторах покрытой ямки; 4 – покрытая вакуоль; 5 – образование рецептосомы и ее слияние с наружной ядерной оболочкой; 6 – высвободившаяся вирусная ДНК.

Рисунок 7 – Проникновение вируса в клетку

Тот же механизм, который лежит в основе слияния вирусных и клеточных мембран, обуславливает индуцированный вирусами гемолиз и слияние плазматических мембран, прилежащих друг к другу клеток с образованием многоядерных клеток, симпластов и синцитиев. Вирусы вызывают два типа слияния клеток: 1) «слияние снаружи» и 2) «слияние изнутри». «Слияние снаружи» происходит при высокой множественности инфекции и обнаруживается в течение первых часов после заражения.

Этот тип слияния, описанный для парамиксовирусов, обусловлен белками заражающего вируса и не требует внутриклеточного синтеза вирусных компонентов. Напротив, «слияние изнутри» происходит при низкой множественности инфекции, обнаруживается на сравнительно поздних стадиях инфекционного процесса и обусловлено вновь синтезированными вирусными белками. «Слияние изнутри» описано для многих вирусов: вирусов герпеса, онковирусов, возбудителей медленных инфекций и др. Этот тип слияния вызывают те же вирусные гликопротеиды, которые обеспечивают проникновение вируса в клетку.

3.6.3 Раздевание

Проникшие в клетку вирусные частицы должны раздеться для того, чтобы вызвать инфекционный процесс. Смысл раздевания заключается в удалении вирусных защитных оболочек, которые препятствуют экспрессии вирусного генома. В результате раздевания освобождается внутренний компонент вируса, который способен вызвать инфекционный процесс. Раздевание сопровождается рядом характерных особенностей: в результате распада вирусной частицы исчезает инфекционная активность, в ряде случаев появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к нейтрализующему действию антител, теряется фоточувствительность при использовании ряда препаратов.

Конечными продуктами раздевания являются сердцевины, нуклеокапсиды или нуклеиновые кислоты. Для ряда вирусов было показано, что продуктом раздевания являются не голые нуклеиновые кислоты, а нуклеиновые кислоты, связанные с внутренним вирусным белком. Например, конечным продуктом раздевания пикорнавирусов является РНК, ковалентно связанная с белком VP_g, конечным продуктом раздевания аденовирусов, вируса полиомы и SV40 является ДНК, ковалентно связанная с одним из внутренних вирусных белков.

В ряде случаев способность вирусов вызвать инфекционный процесс определяется возможностью их раздевания в клетке данной системы. Тем самым эта стадия является одной из стадий, лимитирующих инфекцию.

Раздевание ряда вирусов происходит в специализированных участках внутри клетки (лизосомах, структурах аппарата Гольджи, околоядерном пространстве, ядерных порах на ядерной мембране). При слиянии вирусной и клеточной мембран проникновение в клетку сочетается с раздеванием.

Раздевание и внутриклеточный транспорт являются взаимосвязанными процессами: при нарушении правильного внутриклеточного транспорта к местам раздевания вирусная частица попадает в лизосому и разрушается лизосомальными ферментами.

Промежуточные формы при раздевании. Раздевание вирусной частицы осуществляется постепенно в результате серии последовательных реакций. Например, в процессе раздевания пикорнавирусы проходят ряд стадий с образованием промежуточных субвирусных частиц с размерами от 156 S до 12

S. Раздевание вирусов ЕСНО имеет следующие стадии: вирионы (156 S) → А-частицы (130 S) → РНП и пустые капсиды (80 S) → РНК с терминальным белком (12 S). Раздевание аденовирусов происходит в цитоплазме и ядерных порах и имеет по крайней мере 3 стадии: 1) образование субвирусных частиц с большей плотностью, чем вирионы; 2) образование сердцевин, в которых отсутствует 3 вирусных белка; 3) образование ДНК-белкового комплекса, в котором ДНК ковалентно соединена с терминальным белком. Вирус полиомы в процессе раздевания теряет наружные белки и превращается в субвирусную частицу с коэффициентом седиментации 48 S. Затем частицы связываются с ядерными белками (пистопами) и формируется 190 S комплекс (с коэффициентом седиментации 190 S), способный вызвать инфекционный процесс. Вирус гриппа вначале теряет липопротеидную оболочку и превращается в субвирусную частицу, из которой после удаления М-белка освобождается нуклеокапсид.

3.6.4 Транскрипция

Транскрипция – это переписывание ДНК на РНК по законам генетического кода. Это означает, что РНК состоит из нуклеотидных последовательностей, комплементарных ДНК. Нити ДНК в участке транскрипции разделяются и функционируют как матрицы, к которым присоединяются комплементарные нуклеотиды благодаря спариванию комплементарных оснований (аденин связывается с тиминном, урацил – с аденином, гуанин – с цитозином и цитозин – с гуанином) (рисунок 8). Транскрипция осуществляется с помощью специального фермента – РНК-полимеразы, который связывает нуклеотиды путем образования 3'-5'-фосфодиэфирных мостиков. Такое связывание происходит лишь в присутствии ДНК-матрицы.

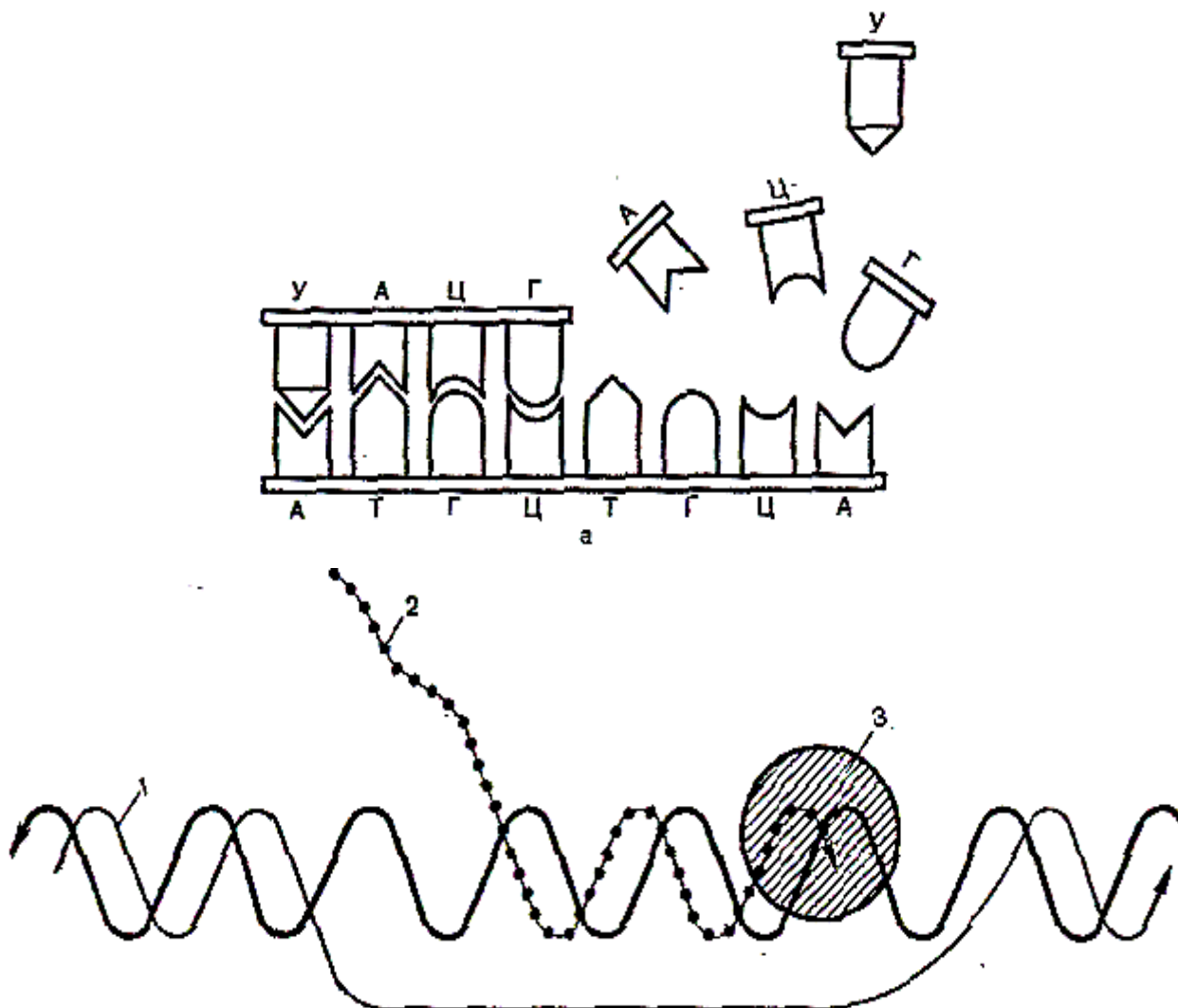
Продуктами транскрипции в клетке являются иРНК. Сама клеточная ДНК, являющаяся носителем генетической информации, не может непосредственно программировать синтез белка. Передачу генетической информации от ДНК к рибосомам осуществляет РНК-посредник.

Реализация генетической информации у вирусов. Стратегия вирусного генома в отношении синтеза иРНК у разных вирусов различна. У ДНК-содержащих вирусов иРНК синтезируется на матрице одной из нитей ДНК. Формула переноса генетической информации у них такая же, как и в клетке.

ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в ядре, используют для транскрипции клеточную полимеразу. К этим вирусам относятся папавирусы, аденовирусы, вирусы герпеса. ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в цитоплазме, не могут использовать клеточный фермент, находящийся в ядре. Транскрипция их генома осуществляется вирусспецифическим ферментом – ДНК-полимеразой, которая проникает в клетку в составе вируса. К этим вирусам относятся вирусы оспы и иридовирусы.

РНК-содержащие вирусы, у которых хранителем генетической информации является не ДНК, а РНК, решают эту проблему особым образом. У

РНК-содержащих «плюс-нитевых» вирусов, у которых функции иРНК выполняет сам геном, передача генетической информации осуществляется по наиболее простой формуле РНК → белок.



а – спаривание комплементарных нуклеотидов при полимеризации; А, Ц, Г, Т, У – сокращенные обозначения аденина, цитозина, гуанина, тимина, урицила; б – схема транскрипции ДНК: 1 – ДНК; 2 – растущая нить РНК; 3 – ДНК-зависимая РНК-полимераза.

Рисунок 8 – Транскрипция ДНК и образование комплементарной РНК-цепочки

К этой группе вирусов относятся пикорнавирусы, тогавирусы, корона-вирусы. У них нет необходимости в акте транскрипции для синтеза вирус-специфических белков. Поэтому, транскрипцию, как самостоятельный процесс у этих вирусов, не выделяют. Иначе обстоит дело у вирусов, геном которых не может выполнять функцию иРНК. В клетке синтезируется комплементарная геному РНК, которая и является информационной. Передача генетической информации у этих вирусов осуществляется по формуле:

РНК → РНК → белок

У этих вирусов транскрипция выделена как самостоятельный процесс в инфекционном цикле. К ним относятся две группы вирусов животных:

1) Вирусы, геном которых представлен однонитчатой РНК: ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, буньявирусы. Поскольку геномная РНК этих вирусов является «минус-нитью», указанную группу вирусов называют «минус-нитевыми» вирусами.

2) Вирусы, геном которых представлен двунитчатой РНК (диплорнавирусы). Среди вирусов животных к ним относятся реовирусы.

В клетке нет фермента, который может полимеризовать нуклеотиды на матрице РНК. Эту функцию выполняет вирусспецифический фермент – РНК-полимераза, или транскриптаза, которая находится в составе вирусов и вместе с ними проникает в клетку.

Среди РНК-содержащих вирусов животных есть семейство ретровирусов, которые имеют уникальный путь передачи генетической информации. РНК этих вирусов переписывается на ДНК, ДНК интегрирует с клеточным геномом и в его составе переписывается на РНК, которая обладает информационными функциями. Путь передачи генетической информации в этом случае осуществляется по более сложной формуле:

РНК → ДНК → РНК → белок

В составе этих вирусов есть уникальный вирусспецифический фермент, который переписывает РНК на ДНК. Этот процесс называется обратной транскрипцией, а фермент – обратная транскриптаза, или ревертаза. Тот же фермент синтезирует нить ДНК на матрице ДНК. Двунитчатая ДНК после замыкания в кольцо интегрирует с клеточным геномом, и транскрипцию интегрированной ДНК в составе клеточных геномов осуществляет клеточная РНК-полимераза. Поскольку иРНК ретровирусов гомологична геномной РНК (а не комплементарна ей), ретровирусы являются «плюс-нитевыми» вирусами.

Ферменты, транскрибирующие вирусный геном. Транскрипция ряда ДНК-содержащих вирусов – паповавирусов, аденовирусов, вирусов герпеса, парвовирусов, гепаднавирусов осуществляется в ядре клетки, и в этом процессе широко используются механизмы клеточной транскрипции – ферменты транскрипции и дальнейшей модификации транскриптов. Транскрипция этих вирусов осуществляется клеточной РНК-полимеразой II – ферментом, который осуществляет транскрипцию клеточного генома. Однако особая группа транскриптов аденовируса синтезируется с помощью другого клеточного фермента – РНК-полимеразы III. У двух других семейств ДНК-содержащих вирусов животных – вирусов оспы и иридовирусов – транскрипция происходит в цитоплазме. Поскольку в цитоплазме нет клеточных полимераз, транскрипция этих вирусов нуждается в специальном вирусном ферменте – вирусной РНК-полимеразе. Этот фермент является структурным вирусным белком.

У РНК-содержащих вирусов транскрипция осуществляется вирусспецифическими транскриптазами, т.е. ферментами, закодированными в вирусном геноме. Вирусспецифические транскриптазы могут быть как структурными белками, входящими в состав вириона (эндогенная транскриптаза), так и неструктурными белками, которые синтезируются в зараженной клетке, но не включаются в вирион.

Транскрипция в зараженной клетке. Синтез комплементарных РНК на родительских матрицах с помощью родительской транскриптазы носит название первичной транскрипции в отличие от вторичной транскрипции, происходящей на более поздних стадиях инфекционного цикла на вновь синтезированных, дочерних матрицах, с помощью вновь синтезированной транскриптазы. Большая часть иРНК в зараженной клетке является продуктом вторичной транскрипции.

Транскриптивные комплексы. У сложно устроенных РНК-содержащих вирусов животных транскрипция происходит не на матрице голой РНК, а в составе вирусных нуклеокапсидов или сердцевин (транскриптивные комплексы). Связанные с геномом капсидные белки не только не препятствуют транскрипции, но и необходимы для нее, обеспечивая правильную конформацию твиста РНК, защиту его от клеточных протеаз, связь отдельных фрагментов генома друг с другом, а также регуляцию транскрипции.

Вновь синтезированные иРНК выходят из транскриптивных комплексов и транспортируются к рибосомам.

На модели реовирусов было показано, что обе нити двунитчатых молекул РНК остаются в составе сердцевин, а вновь синтезированные иРНК выталкиваются из сердцевин через отверстия в 12 полых цилиндрах, находящихся в составе сердцевин.

Регуляция транскрипции. Транскрипция вирусного генома строго регулируется на протяжении инфекционного цикла. Регуляция осуществляется как клеточными, так и вирусспецифическими механизмами. У некоторых вирусов, в основном ДНК-содержащих, существует три периода транскрипции – сверхранняя, ранняя и поздняя. К этим вирусам относятся вирусы оспы, герпеса, паповавирусы, аденовирусы. В результате сверхранней и ранней транскрипции избирательно считываются сверхранние и ранние гены с образованием сверхранних или ранних иРНК. При поздней транскрипции считывается другая часть вирусного генома – поздние гены, с образованием поздних иРНК. Количество поздних генов обычно превышает количество ранних генов. Многие сверхранние гены являются генами для неструктурных белков – ферментов и регуляторов транскрипции и репликации вирусного генома. Напротив, поздние гены обычно являются генами для структурных белков. Обычно при поздней транскрипции считывается весь геном, но с преобладанием транскрипции поздних генов.

Фактором регуляции транскрипции у ядерных вирусов является транспорт транскриптов из ядра в цитоплазму, к месту функционирования иРНК – полисомам.

Продуктом сверхранней транскрипции вирусов герпеса являются α -белки. Функция одного или нескольких из них необходима для транскрипции следующей группы генов, кодирующих β -белки. В свою очередь β -белки включают транскрипцию последней группы поздних генов, кодирующих γ -белки. Такой тип регуляции получил название «каскадной».

У РНК-содержащих вирусов синтез транскриптов также строго контролируется в отношении как количества каждого класса транскриптов, так и

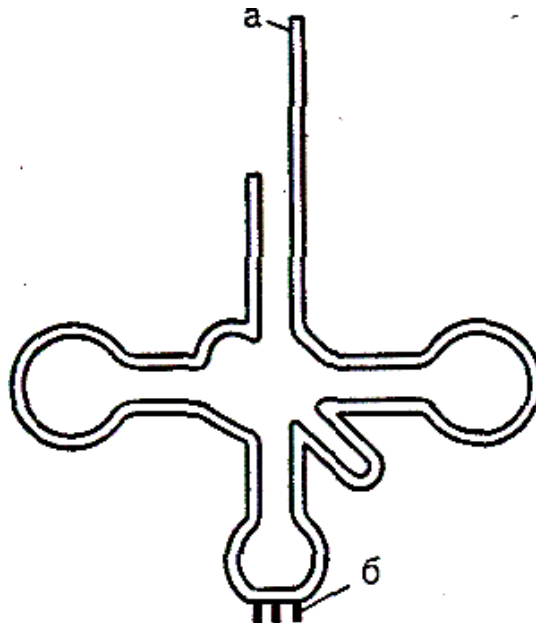
периода инфекции, когда определенные транскрипты синтезируются с максимальной скоростью. На ранней стадии инфекции преимущественно синтезируются транскрипты двух генов вируса гриппа – NP и NS, на поздней стадии инфекции – транскрипты генов M, HA и NA. Остальные три гена для Р-белков синтезируются примерно с одинаковой скоростью на протяжении всего периода инфекции. У реовирусов на ранней стадии инфекции преимущественно транскрибируется 4 из 10 фрагментов генома и лишь на поздней стадии транскрибируется весь геном. Однако если поместить геном вируса в бесклеточную РНК-синтезирующую систему, будет происходить равномерная транскрипция всех 10 фрагментов генома. Эти факты говорят о жестком контроле транскрипции со стороны клетки-хозяина и возможном наличии специфических клеточных регуляторов.

У парамиксовирусов и рабдовирусов весь геном представляет собой одну транскрипционную единицу с единственным промотором (участок связывания транскриптазы и начала транскрипции) у 3'-конца. Вдоль генома существует как бы градиент эффективности транскрипции. Ближайший к 3'-концу ген (ген наиболее обильного белка NP) считывается наиболее часто. Напротив, ген для самого высокомолекулярного белка – транскриптазы – содержащегося лишь в количестве нескольких молекул на вирион, находится на противоположном конце генома и транскрибируется значительно реже. Такая регуляция экспрессии генов путем порядка их расположения в геноме носит название «полярность». При этом способе регуляции количество молекул полипептидов определяется полярностью гена, т.е. расстоянием его от промотора.

3.6.5 Трансляция

Синтез белка в клетке происходит в результате трансляции иРНК. Трансляцией называется процесс перевода генетической информации, содержащейся в иРНК, на специфическую последовательность аминокислот. Иными словами, в процессе трансляции осуществляется перевод 4-буквенного языка азотистых оснований на 20-буквенный язык аминокислот.

Транспортные РНК. Свою аминокислоту тРНК узнают по конфигурации ее боковой цепи, а специфический фермент аминоацил-синтетаза катализирует ассоциацию тРНК с аминокислотой. В клетке существует большое количество разнообразных видов тРНК. Поскольку для каждой аминокислоты должна быть своя тРНК, количество видов тРНК должно быть не меньше 20, однако в клетке их значительно больше. Это связано с тем, что для каждой аминокислоты существует не один, а несколько видов тРНК. Молекула тРНК представляет собой одонитчатую РНК со сложной структурой в виде кленового листа (рисунок 9). Один ее конец связывается с аминокислотой (конец а), а противоположный – с нуклеотидами иРНК, которым они комплементарны (конец б). Три нуклеотида на иРНК кодируют одну аминокислоту и называются «триплет» или «кодон», комплементарные кодону три нуклеотида на конце тРНК называются «антикодон».



а – участок связывания с аминокислотой; б – участок связывания с иРНК (автикодон).

Рисунок 9 – Строение транспортной РНК

Рибосомы. Синтез белка в клетке осуществляется на рибосоме. Рибосома состоит из двух субъединиц, большой и малой, малая субъединица, примерно, в два раза меньше большой. Обе субъединицы содержат по одной молекуле рибосомальной РНК и ряд белков. Рибосомальные РНК синтезируются в ядре на матрице ДНК с помощью РНК-полимеразы. В малой рибосомальной субъединице есть канал, в котором находится информационная РНК. В большой рибосомальной субъединице есть две полости, захватывающие также малую рибосомальную субъединицу. Одна из них содержит аминокатильный центр (А-центр), другая – пептидильный центр (П-центр).

Фазы трансляции. Процесс трансляции состоит из трех фаз: 1) инициации, 2) элонгации и 3) терминации.

Инициация трансляции. Это наиболее ответственный этап в процессе трансляции, основанный на узнавании рибосомой иРНК и связывании с ее особыми участками. Рибосома узнает иРНК благодаря «шапочке» на 5'-конце и скользит к 3'-концу, пока не достигнет инициаторного кодона, с которого начинается трансляция. В эукариотической клетке инициаторным кодоном является кодон АУГ или ГУГ, кодирующие метионин. С метионина начинается синтез всех полипептидных цепей.

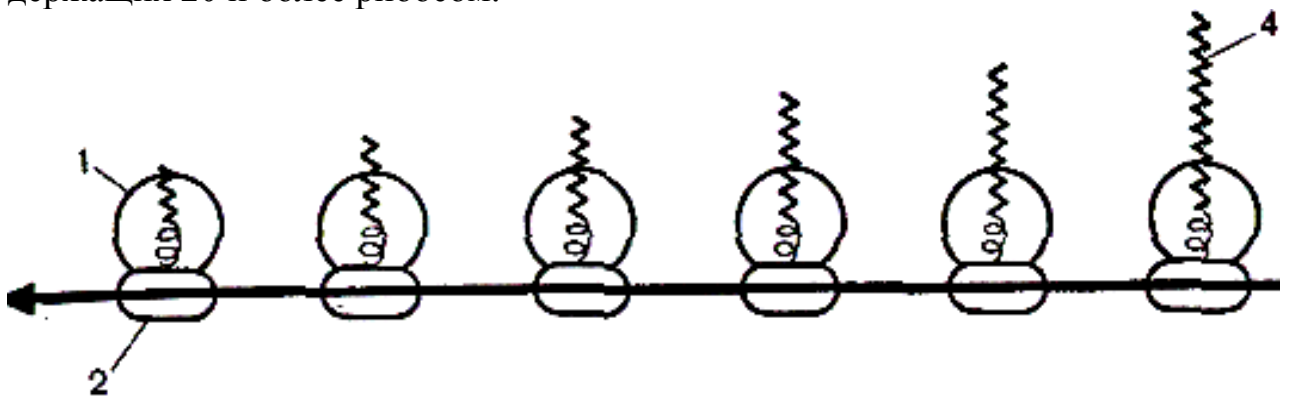
Вначале с иРНК связывается малая рибосомальная субъединица. К комплексу иРНК с малой рибосомальной субъединицей присоединяются другие компоненты, необходимые для начала трансляции. Это несколько молекул, которые называются «инициаторные факторы».

Их, по крайней мере, три в прокариотической клетке и более девяти в эукариотической клетке. Инициаторные факторы определяют узнавание рибосомой специфических иРНК и, таким образом, являются определяющим фактором в дискриминации между различными иРНК, присутствующими в клетке, как правило, в избыточном количестве.

В результате формируется комплекс, необходимый для инициации трансляции, который называется инициаторным комплексом. В инициаторный комплекс входят: 1) иРНК; 2) малая рибосомальная субъединица; 3) аминоацил-тРНК, несущая инициаторную аминокислоту; 4) инициаторные факторы; 5) несколько молекул ГТФ.

В рибосоме осуществляется слияние потока информации с потоком аминокислот. Аминоацил-тРНК входит в А-центр большой рибосомальной субъединицы, и ее антикодон взаимодействует с кодоном иРНК, находящейся в малой рибосомальной субъединице. При продвижении иРНК на один кодон тРНК перебрасывается в пептидный центр, и ее аминокислота присоединяется к инициаторной аминокислоте с образованием первой пептидной связи. Свободная от аминокислоты тРНК выходит из рибосомы и может опять функционировать в транспорте специфических аминокислот. На ее место из А-центра в П-центр перебрасывается новая тРНК и образуется новая пептидная связь, в А-центре появляется вакантный кодон иРНК, к которому немедленно присоединяется соответствующая тРНК и происходит присоединение новых аминокислот к растущей полипептидной цепи (рисунок 10).

Элонгация трансляции. Это процесс удлинения, наращивания полипептидной цепи, основанный на присоединении новых аминокислот с помощью пептидной связи. Происходит постоянное протягивание нити иРНК через рибосому и «декодирование» заложенной в ней генетической информации (рисунок 10). иРНК функционирует на нескольких рибосомах, каждая из которых синтезирует одну и ту же полипептидную нить, кодируемую данной иРНК. Группа рибосом, работающих на одной молекуле иРНК, называется полирибосомой, или полисомой. Размер полисомы значительно варьирует в зависимости от длины молекулы иРНК, а также от расстояния между рибосомами. Так, полисомы, которые синтезируют гемоглобин, состоят из 4-6 рибосом, высокомолекулярные белки синтезируются на полирибосомах, содержащих 20 и более рибосом.



1 – большая рибосомальная субъединица; 2 – малая рибосомальная субъединица; 3 – иРНК; 4 – растущая полипептидная нить.

Рисунок 10 – Синтез белков на полисомах

Терминация трансляции. Терминация трансляции происходит в тот момент, когда рибосома доходит до терминирующего кодона в составе

иРНК. Трансляция прекращается, и полипептидная цепь освобождается из полирибосомы. После окончания трансляции полирибосомы распадаются на субъединицы, которые могут войти в состав новых полирибосом.

Свойства полирибосом. По топографии в клетке полирибосомы делят на две большие группы – свободные и связанные с мембранами эндоплазматической сети, которые составляют соответственно 75 и 25%. Между двумя группами полирибосом нет принципиальных структурных и функциональных различий, они формируются из одного и того же пула субъединиц и в процессе трансляции могут обмениваться субъединицами. Мембраны, с которыми связаны полирибосомы, называются грубыми или шероховатыми мембранами в отличие от гладких мембран, не содержащих полирибосомы. Связь полирибосом с мембранами осуществляется с помощью сигнального пептида – специфической последовательности на аминоконце синтезирующихся гликопротеидов. На связанных с мембранами полирибосомах синтезируются внутримембранные белки, которые сразу же после синтеза оказываются в составе мембран.

Трансляция в зараженных вирусом клетках. Стратегия вирусного генома, использующего клеточный аппарат трансляции, должна быть направлена на создание механизма для подавления трансляции собственных клеточных иРНК и для избирательной трансляции вирусных иРНК, которые всегда находятся в значительно меньшем количестве, чем клеточные матрицы. Этот механизм реализуется на уровне специфического узнавания малой рибосомальной субъединицей вирусных иРНК, т.е. на уровне формирования иницирующего комплекса. Поскольку многие вирусы не подавляют синтез клеточных иРНК, в зараженных клетках возникает парадоксальная ситуация: прекращается трансляция огромного фонда функционально активных клеточных иРНК, и на освободившихся рибосомах начинается трансляция одиночных молекул вирусных иРНК. Специфическое узнавание рибосомой вирусных иРНК осуществляется за счет вирусспецифических инициаторных факторов.

Два способа формирования вирусных белков. Поскольку геном вируса животных представлен молекулой, кодирующей более чем один белок, вирусы поставлены перед необходимостью синтеза либо длинной иРНК, кодирующей один гигантский полипептид-предшественник, который затем должен быть нарезан в специфических точках на функционально активные белки, либо коротких моноцистронных иРНК, каждая из которых кодирует один белок. Таким образом, существуют два способа формирования вирусных белков: 1) иРНК транслируется в гигантский полипептид-предшественник, который после синтеза последовательно нарезается на зрелые функционально активные белки; 2) иРНК транслируется с образованием зрелых белков, или белков, которые лишь незначительно модифицируются после синтеза.

Первый способ трансляции характерен для РНК-содержащих «плюс-нитевых» вирусов – пикорнавирусов и тогавирусов. Их иРНК транслируется в гигантскую полипептидную цепь, так называемый полипротеид, который

сползает в виде непрерывной ленты с рибосомного «конвейера» и нарезается на индивидуальные белки нужного размера. Нарезание вирусных белков является многоступенчатым процессом, осуществляемым как вирусспецифическими, так и клеточными протеазами. В клетках, зараженных пикорнавирусами, на конце полипротеина-предшественника находится белок с протеазной активностью. Вирусная протеаза осуществляет нарезание предшественника на 3 фрагмента, один из которых является предшественником для структурных белков, второй – для неструктурных белков, функции третьего фрагмента неизвестны. В дальнейшем нарезании участвуют вирусоспецифические и клеточные протеазы.

Интересный вариант первого способа трансляции обнаруживается у альфа-вирусов (семейство тогавирусов). Геномная РНК с коэффициентом седиментации 42 S транслируется с образованием полипептида-предшественника для неструктурных белков. Однако доминирующей в зараженных клетках иРНК является РНК с коэффициентом седиментации 26 S, составляющая одну треть геномной РНК. Эта иРНК транслируется с образованием предшественника для структурных белков.

Второй способ формирования белков характерен для ДНК-содержащих вирусов и большинства РНК-содержащих вирусов. При этом способе синтезируются короткие моноцистронные иРНК в результате избирательной транскрипции одного участка генома (гена). Однако все вирусы широко используют механизм посттрансляционного нарезания белка.

Вирусспецифические полисомы. Поскольку длина вирусных и РНК варьирует в широких пределах, размер вирусспецифических полисом также широко варьирует: от 3-4 до нескольких десятков рибосом на одной нити иРНК. При инфекциях, вызванных пикорнавирусами, формируются крупные полисомы, представляющие собой агрегаты, состоящие из 20-60 рибосом. При инфекциях, вызванных другими вирусами животных, использующими второй способ трансляции, формируются полисомы небольшого размера. Между размерами иРНК и величиной полисом существует определенная корреляция, однако в ряде случаев полисомы имеют больший или меньший размер по сравнению с ожидаемым. Эта особенность вирусных полисом объясняется необычным пространственным расположением рибосом на вирусных матрицах, связанных с меньшей плотностью упаковки рибосом на молекуле иРНК.

Вирусспецифические полисомы могут быть как свободными, так и связанными с мембранами. В зараженных вирусом полиомиелита клетках полипротеид синтезируется на связанных с мембранами полисомах; при инфекциях, вызванных сложно устроенными вирусами, формируются как свободные, так и связанные с мембранами полисомы, которые вовлечены в синтез разных классов вирусных полипептидов. Внутренние белки обычно синтезируются на свободных полисомах, гликопротеиды всегда синтезируются на полисомах, связанных с мембранами.

Модификация вирусных белков. В эукариотической клетке многие белки, в том числе вирусные, подвергаются посттрансляционным модифика-

циям, и зрелые функционально активные белки часто не идентичны их вновь синтезированным предшественникам. Широко распространены такие посттрансляционные ковалентные модификации, как гликозилирование, ацилирование, метилирование, сульфирование (образование дисульфидных связей), протеолитическое нарезание и, наконец, фосфорилирование. В результате вместо 20 генетически закодированных аминокислот из различных клеток разных органов эукариотов выделено около 140 дериватов аминокислот.

Среди широкого спектра модифицированных реакций лишь небольшое количество процессов является обратимыми: 1) фосфорилирование-дефосфорилирование; 2) ацилирование-деацилирование; 3) метилирование-деметилование; 4) образование дисульфидных связей. Среди подобных обратимых модификаций белков следует искать процессы, обуславливающие механизм регуляции активности белков в эукариотической клетке.

Гликозилирование. В составе сложно устроенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов имеются белки, содержащие ковалентно присоединенные боковые цепочки углеводов – гликопротеиды. Гликопротеиды расположены в составе вирусных оболочек и находятся на поверхности вирусных частиц. Своей гидрофобной частью они погружены в двойной слой липидов, а некоторые гликопротеиды проникают через него и взаимодействуют с внутренним компонентом вируса (рисунок 11). Гидрофильная часть молекулы обращена наружу.

Синтез и внутриклеточный транспорт гликопротеидов характеризуется рядом особенностей, присущих клеточным внутримембранным белкам. Их синтез осуществляется на полисомах, ассоциированных с мембранами, и белки сразу же после синтеза попадают в шероховатые мембраны, откуда транспортируются в мембраны эндоплазматической сети и в комплекс Гольджи, где происходит модификация и комплектование углеводной цепочки, а затем – в плазматическую мембрану в ряде случаев путем слияния с ней везикул комплекса Гольджи. Такой целенаправленный транспорт осуществляется благодаря имеющейся на аминоконце белка специфической последовательности из 20-30 аминокислот (сигнальному пептиду). Сигнальный пептид отрезается от белковой молекулы после того, как гликопротеид достигает плазматической мембраны.

Гликозилирование полипептидов является сложным многоступенчатым процессом, первые этапы которого начинаются уже в процессе синтеза полипептидов, и первый сахар присоединяется к полипептидной цепи, еще не сошедшей с рибосомы. Последующие этапы гликозилирования происходят путем последовательного присоединения сахаров в виде блоков к углеводной цепочке в процессе транспорта полипептида к плазматической мембране. Окончательное формирование углеводной цепочки может завершаться на плазматической мембране перед сборкой вирусной частицы. Процесс гликозилирования не влияет на транспорт полипептида к плазматической мембране, но имеет существенное значение для экспрессии биологической активности белка. При подавлении гликозилирования соответствующими ингибиторами (аналоги Сахаров типа 2-дезоксиглюкозы, антибиотик туникамицин)

нарушается синтез полипептидов, блокируется сборка вирионов миксовирусов, рабдовирусов, альфавирусов или образуются неинфекционные вирионы герпеса и онковирусов.

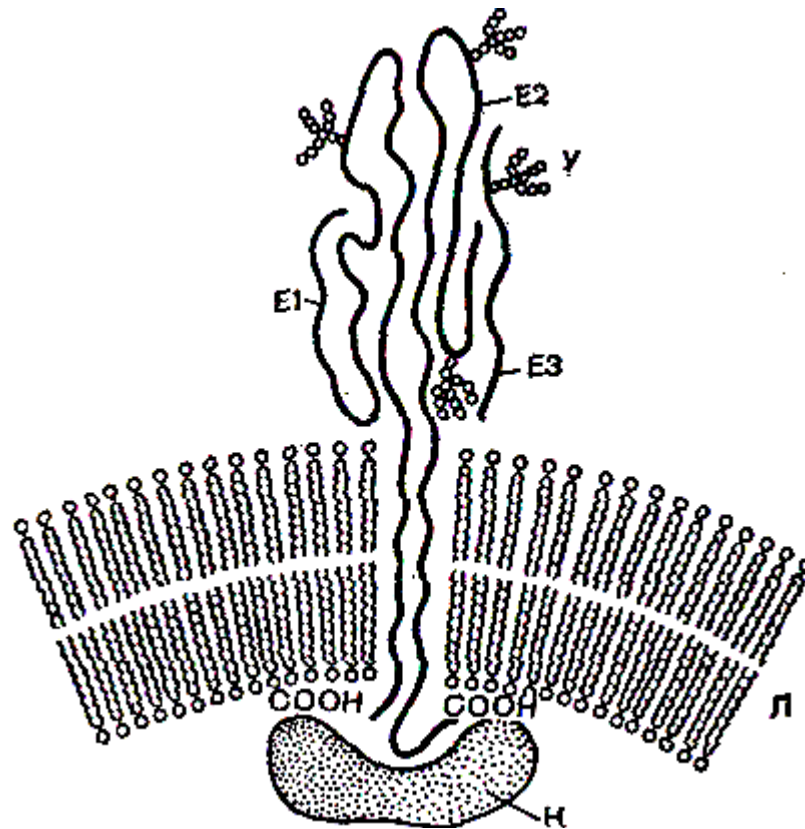
Сульфирование. Некоторые белки сложно устроенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов сульфатируются после трансляции. Чаще всего сульфированию подвергаются гликопротеиды, при этом сульфатная группа связывается с сахарным компонентом гликопротеида.

Ацилирование. Ряд гликопротеидов сложно устроенных РНК-содержащих вирусов (НА2 вируса гриппа, белок G вируса везикулярного стоматита, белок HN вируса ньюкаслской болезни и др.) содержат ковалентно связанные 1-2 молекулы жирных кислот.

Нарезание. Многие вирусные белки и в первую очередь гликопротеиды приобретают функциональную активность лишь после того, как произойдет их нарезание в специфических точках протеолитическими ферментами. Нарезание происходит либо с образованием двух функциональных белковых субъединиц (например, большая и малая субъединицы гемагглютинирина вируса гриппа, два гликопротеида, E₂ и E₃, вируса леса Семлики) либо с образованием одного функционально активного белка и неактивного фрагмента, например белки F и HN парамиксовирусов. Нарезание обычно осуществляется клеточными ферментами. У многих сложно устроенных вирусов животных, имеющих гликопротеид, нарезание необходимо для формирования активных прикрепительных белков и белков слияния и, следовательно, для приобретения вирусом способности инфицировать клетку. Лишь после нарезания этих белков вирусная частица приобретает инфекционную активность. Таким образом, можно говорить о протеолитической активации ряда вирусов, осуществляемой с помощью клеточных ферментов.

Фосфорилирование. Фосфорпротеиды содержатся практически в составе всех вирусов животных, РНК- и ДНК-содержащих, просто и сложно устроенных. В составе большинства вирусов обнаружены протеинкиназы, однако фосфорилирование может осуществляться как вирусными, так и клеточными ферментами. Обычно фосфорилируются белки, связанные с вирусным геномом и осуществляющие регулируемую роль в его экспрессии. Одним из примеров является фосфорилирование белка онкогенных вирусов, обуславливающего клеточную трансформацию. Этот белок является продуктом гена Src и одновременно протеинкиназой и фосфопротеидом, т.е. способен к самофосфорилированию.

С процессом фосфорилирования связан механизм антивирусного действия интерферона. В зараженных вирусом клетках интерферон индуцирует синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует субъединицу иницирующего фактора трансляции ЭИФ-2, в результате чего блокируется трансляция вирусных информационных РНК. Фосфорилирование белков играет регулируемую роль в транскрипции и трансляции вирусных иРНК, специфическом узнавании вирусных иРНК рибосомой, белокнуклеиновом и белок-белковом узнавании на стадии сборки вирусных частиц.



E1, E2, E3 – молекулы вирусных гликопротеидов; К – капсидный белок; У – углеводные цепочки; Л – липидный бислой.

Рисунок 11 – Строение липопротеидной оболочки вируса Синдбяс

3.6.6 Репликация

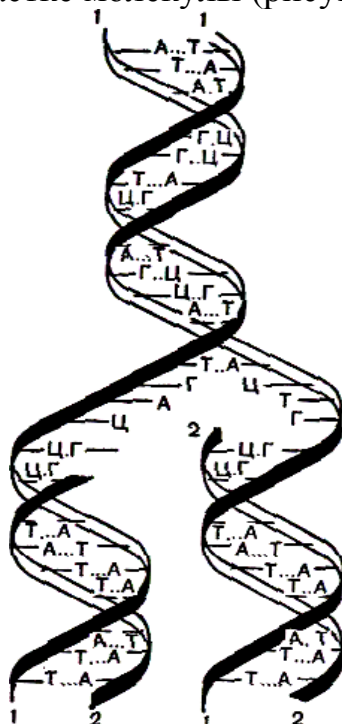
Репликацией называется синтез молекул нуклеиновой кислоты, гомологичных геному. В клетке происходит репликация ДНК, в результате которой образуются дочерние двунитчатые ДНК. Репликация происходит на расплетенных участках ДНК и идет одновременно на обеих нитях от 5'-конца к 3'-концу. Поскольку две нити ДНК имеют противоположную полярность 5'-*3' и 3' → 5', а участок репликации («вилка») движется в одном направлении, одна цепь строится в обратном направлении отдельными фрагментами, которые называются фрагментами Оказаки (по имени ученого, впервые предложившего такую модель). После синтеза фрагменты Оказаки «сшиваются» лигазой в единую нить.

Репликация ДНК осуществляется ДНК-полимеразами. Для начала репликации необходим предварительный синтез короткого участка РНК на матрице ДНК, который называется затравкой. С затравки начинается синтез нити ДНК, после чего РНК быстро удаляется с растущего участка.

Репликация вирусных ДНК. Репликация генома ДНК-содержащих вирусов в основном катализируется клеточными фрагментами и механизм ее сходен с механизмом репликации клеточной ДНК.

Каждая вновь синтезированная молекула ДНК состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной нити. Такой механизм репликации называется полуконсервативным,

У вирусов, содержащих кольцевые двунитчатые ДНК (паповавирусы), разрезается одна из нитей ДНК, что ведет к раскручиванию и снятию супервитков на определенном участке молекулы (рисунок 12).



Полинуклеотидные цепи двойной спирали ДНК расплетаются и образуются две новые двойные спирали. Каждая из них состоит из родительской (1) и вновь синтезированной (2) цепи.

Рисунок 12 – Репликация ДНК (схема)

При репликации однонитчатых ДНК (семейство парвовирусов) происходит образование двух нитчатых форм, которые представляют собой промежуточные репликативные формы.

Репликация вирусных РНК. В клетке нет ферментов, способных осуществить репликацию РНК. Поэтому ферменты, участвующие в репликации, всегда вирусспецифическую репликацию осуществляет тот же фермент, что и транскрипцию; репликаза является либо модифицированной транскриптазой, либо при репликации соответствующим образом модифицируется матрица.

Репликация однонитчатых РНК осуществляется в два этапа: вначале синтезируются комплементарные геному нити, которые в свою очередь становятся матрицами для синтеза копий генома. У «минус-нитевых» вирусов первый этап репликации – образование комплементарных нитей сходен с процессом транскрипции. Однако между ними есть существенное отличие, если при транскрипции считываются определенные участки генома, то при репликации считывается весь геном. Например, иРНК парамиксовирусов и рабдовирусов являются короткими молекулами, комплементарными разным участкам генома, а иРНК вируса гриппа на 20-30 нуклеотидов короче каждого фрагмента генома. В то же время матрицы для репликации являются полной комплементарной последовательностью генома и называются антигеномом. В зараженных клетках существует механизм переключения транскрип-

ции на репликацию. У «минус-нитевых» вирусов этот механизм обусловлен маскировкой точек терминации транскрипции на матрице генома, в результате чего происходит сквозное считывание генома. Точки терминации маскируются одним из вирусных белков.

При репликации растущая «плюс-нить» вытесняет ранее синтезированную «плюс-нить» либо двуспиральная матрица консервируется (рисунок 13). Более распространен первый механизм репликации.

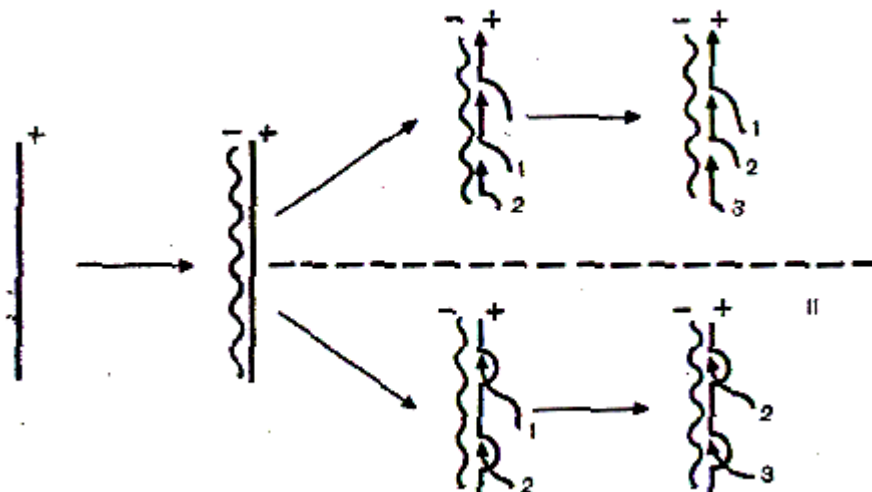
Репликативные комплексы. Поскольку образующиеся нити ДНК и РНК некоторое время остаются связанными с матрицей, в зараженной клетке формируются репликативные комплексы, в которых осуществляется весь процесс репликации (а в ряде случаев также и транскрипции) генома. Репликативный комплекс содержит геном, репликазу и связанные с матрицей вновь синтезированные цепи нуклеиновых кислот. Вновь синтезированные геномные молекулы немедленно ассоциируются с вирусными белками, поэтому в репликативных комплексах обнаруживаются антигены. В процессе репликации возникает частично двунитчатая структура с одонитчатыми «хвостами», так называемый репликативный предшественник (РП).

Репликативные комплексы ассоциированы с клеточными структурами либо с предсуществующими, либо вирусиндуцируемыми. Например, репликативные комплексы пикорнавирусов ассоциированы с мембранами эндоплазматической сети, вирусов оспы – с цитоплазматическим матриксом, репликативные комплексы аденовирусов и вирусов герпеса в ядрах находятся в ассоциации со вновь сформированными волокнистыми структурами и связаны с ядерными мембранами. В зараженных клетках может происходить усиленная пролиферация клеточных структур, с которыми связаны репликативные комплексы, или их формирование из предшествующего материала. Например, в клетках, зараженных пикорнавирусами, происходит пролиферация гладких мембран. В клетках, зараженных реовирусами, наблюдается скопление микротрубочек; в клетках, зараженных вирусами оспы, происходит формирование цитоплазматического матрикса.

В репликативных комплексах одновременно с синтезом геномных молекул осуществляется транскрипция и происходит сборка нуклеокапсидов и сердцевин, а при некоторых инфекциях – и вирусных частиц. О сложной структуре репликативных комплексов говорит, например, такой состав репликативного комплекса аденовирусов: реплицирующиеся ДНК, одонитчатые ДНК, одонитчатые РНК, ферменты репликации и транскрипции, структурные и неструктурные вирусные белки и ряд клеточных белков.

Регуляция репликации. Вновь образованная молекула геномной РНК может быть использована различным образом. Она может ассоциироваться с капсидными белками и войти в состав вириона, служить матрицей для синтеза новых геномных молекул, либо – для образования иРНК, наконец, у «плюс-нитевых» вирусов она может выполнять функции иРНК и связываться с рибосомами. В клетке существуют механизмы, регулирующие использование геномных молекул. Регуляция идет по принципу саморегуляции и реализуется путем взаимодействия вирусных РНК и белков благодаря возможно-

сти белокнуклеинового и белок-белкового узнавания. Например, роль терминального белка пикорнавирусов заключается в запрещении трансляции и РНК и отборе молекул для формирования вирионов. Белок, связывающийся с 5'-концом геномной РНК, в свою очередь узнается капсидными белками и служит сигналом для сборки вирусной частицы с участием данной молекулы РНК. По тому же принципу отбираются геномные молекулы РНК у «минус-нитевых» вирусов к 3'-концу геномных РНК присоединяется молекула капсидного вирусного белка к которой подстраиваются другие белковые субъединицы в результате белок-белкового узнавания, и такая молекула РНК войдет в состав вириона или послужит матрицей для репликации. Для переключения ее на транскрипцию должен возникнуть запрет белокнуклеинового взаимодействия. В репликации ДНК аденовирусов участвует молекула белка, которая связывается с концом вирусной ДНК и необходима для начала репликации. Таким образом, для начала репликации необходим синтез вирусных белков: в присутствии ингибиторов белкового синтеза отсутствует переключение транскрипции на репликацию.



I – вытеснение ранее синтезированной нити растущей «плюс-нитью»; II – консервирование двухспиральной матрицы; 1, 2, 3 – вновь синтезированные нити РНК.

Рисунок 13 – Два способа репликации «плюс-нитевой» РНК (схема)

3.6.7 Сборка вирусных частиц

Синтез компонентов вирусных частиц в клетке разобщен и может протекать в разных структурах ядра и цитоплазмы. Вирусы, репликация которых проходит в ядрах, условно называют ядерными. В основном это ДНК-содержащие вирусы: аденовирусы, паповавирусы, парвовирусы, вирусы герпеса. Вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме, называют цитоплазматическими. К ним относятся из ДНК-содержащих вирус оспы и большинство РНК-содержащих вирусов, за исключением ортомиксовирусов и ретровирусов. Однако это разделение весьма относительно, потому что в репродукции

тех и других вирусов есть стадии, протекающие соответственно в цитоплазме и ядре.

Внутри ядра и цитоплазмы синтез вирусспецифических молекул также может быть разобщен. Так, например, синтез одних белков осуществляется на свободных полисомах, а других – на полисомах, связанных с мембранами. Вирусные нуклеиновые кислоты синтезируются в ассоциации с клеточными структурами вдали от полисом, которые синтезируют вирусные белки. При таком дисъюнктивном способе репродукции образование вирусной частицы возможно лишь в том случае, если вирусные нуклеиновые кислоты и белки обладают способностью при достаточной концентрации узнавать друг друга в многообразии клеточных белков и нуклеиновых кислот и самопроизвольно соединяться друг с другом, т.е. способны к самосборке.

В основе самосборки лежит специфическое белокнуклеиновое и белок-белковое узнавание, которое может происходить в результате гидрофобных, солевых и водородных связей, а также стерического соответствия. Белокнуклеиновое узнавание ограничено небольшим участком молекулы нуклеиновой кислоты и определяется уникальными последовательностями нуклеотидов в не кодирующей части вирусного генома. С этого узнавания участка генома вирусными капсидными белками начинается процесс сборки вирусной частицы. Присоединение остальных белковых молекул осуществляется за счет специфических белок-белковых взаимодействий или неспецифических белокнуклеиновых взаимодействий.

В связи с разнообразием структуры вирусов животных разнообразны и способы формирования вирионов, однако можно сформулировать следующие общие принципы сборки.

1 У просто устроенных вирусов формируются провирионы, которые затем в результате модификаций белков превращаются в вирионы. У сложно устроенных вирусов сборка осуществляется многоступенчато. Сначала формируются нуклеокапсиды или сердцевин, с которыми взаимодействуют белки наружных оболочек.

2 Сборка сложно устроенных вирусов (за исключением сборки вирусов оспы и реовирусов) осуществляется на клеточных мембранах. Сборка ядерных вирусов происходит с участием ядерных мембран, сборка цитоплазматических вирусов – с участием мембран эндоплазматической сети или плазматической мембраны, куда независимо друг от друга прибывают все компоненты вирусной частицы.

3 У ряда сложно устроенных вирусов существуют специальные гидрофобные белки, выполняющие функции посредников между сформированными нуклеокапсидами и вирусными оболочками. Такими белками являются матриксные белки у ряда «минус-нитевых» вирусов (ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов).

4 Сборка нуклеокапсидов, сердцевин, провирионов и вирионов происходит не во внутриклеточной жидкости, а в специальных структурах, предсуществующих в клетке или индуцированных вирусом («фабриках»).

5 Сложно устроенные вирусы для построения своих частиц используют ряд элементов клетки-хозяина, например липиды, некоторые ферменты, у ДНК-геномного SV40 – гистоны, у оболочечных РНК-геномных вирусов – актин, а в составе ареновирусов обнаружены даже рибосомы. Клеточные молекулы несут определенные функции в вирусной частице, однако включение их в вирион может явиться и следствием случайной контаминации, как, например, включение ряда ферментов клеточных оболочек или клеточных нуклеиновых кислот.

Сборка РНК-содержащих вирусов. Сборка просто устроенных РНК-содержащих вирусов заключается в ассоциации вирусного генома с вирусными капсидными белками с образованием нуклеокапсида.

У сложно устроенных РНК-содержащих вирусов процессы сборки нуклеокапсидов, сердцевин и зрелых вирионов обычно разобщены. Нуклеокапсиды мигрируют к месту сборки вирусных частиц – плазматической мембране (или мембранам эндоплазматической сети) и упорядочение выстраиваются под участками мембран, с наружной стороны которых уже встроены вирусные суперкапсидные белки. Сборка заключается в том, что участки, содержащие гликопротеиды с примыкающими к ним нуклеокапсидами, постепенно выпячиваются через модифицированную клеточную мембрану. В результате выпячивания образуется «почка», содержащая нуклеокапсид и оболочку с суперкапсидными белками. «Почка» отделяется от клеточной мембраны с образованием свободной вирусной частицы. Такой способ формирования вирусных частиц называется почкованием. Почкование может происходить – через плазматическую мембрану клетки в наружную среду, как у ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов и альфа-вирусов, либо через мембраны эндоплазматической сети в вакуоли, как у ареновирусов и буньявирусов, В основе выпячивания почки через мембрану лежат обычные клеточные процессы, направленные на отторжение непригодного для клетки материала в обновление мембран. Участок будущей почки содержит фиксированный нуклеокапсид, ассоциированный с суперкапсидными белками, но движение мембранных липидов продолжается в силу их текучести, липиды обволакивают будущую почку и вместе с ними из «почки» вытесняются клеточные мембранные белки. В результате этого движения происходит выбухание «почки» над клеточной мембраной. Механизм образования «почки» объясняет, почему в составе почкующихся вирусов не содержится клеточных мембранных белков.

Все вирусные компоненты – нуклеокапсиды и суперкапсидные белки прибывают к месту сборки независимо друг от друга. Первыми к месту сборки прибывают суперкапсидные белки. Обычно этими белками являются гликопротеиды, которые синтезируются в полисомах, связанных с мембранами, и через шероховатые, а затем гладкие мембраны в результате слияния с ними везикул комплекса Гольджи транспортируются на наружную поверхность плазматических мембран или остаются в составе везикул.

Включение гликопротеидов в определенные зоны клеточных мембран приводит к модификациям мембран. Нуклеокапсид узнает эти участки и под-

ходит к ним с внутренней стороны липидного бислоя. Узнавание осуществляется с помощью одного из двух механизмов: 1) нуклеокапсид взаимодействует с участком гликопротеида, пронизывающим клеточную мембрану и вышедшим на ее внутреннюю поверхность. Такой механизм имеет место у альфа-вирусов; гидрофобный фрагмент гликопротеида E1 проникает через липидный слой на его внутреннюю поверхность, и с этим фрагментом связываются нуклеокапсиды, которые позже войдут в состав «почки»; 2) в сборку вовлекается еще один вирусный белок, являющийся медиатором сборки, который называется мембранным, или матриксным белком. М-белок синтезируется на свободных полисомах, но сразу после синтеза встраивается в клеточные мембраны с внутренней цитоплазматической стороны липидного бислоя. Этот белок в высокой степени гидрофобен и поэтому способен к белок-белковым и белоклипидным взаимодействиям.

Включение М-белка в клеточные мембраны является сигналом для сборки вирусной частицы: вслед за включением немедленно следует связывание нуклеокапсидов с мембранами и почкование вирусной частицы. Тем самым М-белок обладает функцией лимитирующего сборку фактора.

Сборка ДНК-содержащих вирусов, В сборке ДНК-содержащих вирусов есть некоторые отличия от сборки РНК-содержащих вирусов. Как и у РНК-содержащих вирусов, сборка ДНК-содержащих вирусов является многоступенчатым процессом с образованием промежуточных форм, отличающихся от зрелых вирионов по составу полипептидов. Первый этап сборки заключается в ассоциации ДНК с внутренними белками и формировании сердцевин или нуклеокапсидов. При этом ДНК соединяется с предварительно сформированными «пустыми» капсидами.

В результате связывания ДНК с капсидами появляется новый класс промежуточных форм, которые называются неполными формами. Помимо неполных форм с разным содержанием ДНК, существует другая промежуточная форма в морфогенезе – незрелые вирионы, отличающиеся от зрелых тем, что содержат не нарезанные предшественники полипептидов. Таким образом, морфогенез вирусов тесно связан с модификацией (процессингом) белков.

Сборка ядерных вирусов начинается в ядре, обычно – с ассоциации с ядерной мембраной. Формирующиеся в ядре промежуточные формы вируса герпеса почкуются в перинуклеарное пространство через внутреннюю ядерную мембрану, и вирус приобретает таким путем оболочку, которая является дериватом ядерной мембраны. Дальнейшая достройка и созревание вирионов происходит в мембранах эндоплазматической сети и в аппарате Гольджи, откуда вирус в составе цитоплазматических везикул транспортируется на клеточную поверхность.

У не почкующихся липидсодержащих вирусов – вирусов оспы сборка вирионов происходит в уже описанных цитоплазматических вирусных «фабриках». Липидная оболочка вирусов в «фабриках» формируется из клеточных липидов путем автономной самосборки, поэтому липидный состав оболочек значительно отличается от состава липидов в клеточных мембранах.

3.6.8 Выход вирусных частиц из клетки

Существуют два способа выхода вирусного потомства из клетки: 1) путем «взрыва»; 2) путем почкования.

Выход из клетки путем взрыва связан с деструкцией клетки, нарушением ее целостности, в результате чего находящиеся внутри клетки зрелые вирусные частицы оказываются в окружающей среде. Такой способ выхода из клетки присущ вирусам, не содержащим липопротеидной оболочки (пикорна-, рео-, парво-, папова-, аденовирусы). Однако некоторые из этих вирусов могут транспортироваться на клеточную поверхность до гибели клетки.

Выход из клеток путем почкования присущ вирусам, содержащим липопротеидную мембрану, которая является дериватом клеточных мембран. При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство, пока не произойдет полное истощение ее ресурсов.

3.7 Репликативный цикл у некоторых групп вирусов

3.7.1 +РНК-вирусы

+РНК-вирусы (пикорна-, флави- и тогавирусы). Геном прямо транслируется клеточными рибосомами в виде гигантской молекулы белка, расщепляющейся на более мелкие по окончании синтеза, *т.е. геном непосредственно выполняет функции иРНК* (рисунок 14).

3.7.1.1 Пикорнавирусы

Пикорнавирусы размножаются подобно большинству +РНК-содержащих вирусов; среди них наиболее изучен **полиовирус** – вирус небольшого размера с голым капсидом и единичной молекулой +РНК. Спектр адсорбционных возможностей полиовируса ограничен клетками приматов и человека, имеющих специфические рецепторы. Репликация полностью осуществляется в цитоплазме клетки. У полиовирусов отмечают полное и неполное считывание генетической информации: 5'-регион +РНК, кодирующий структуру вирусных белков, транслируется в обязательном порядке, тогда как 3'-регион, кодирующий вирусную полимеразу, транслируется значительно реже.

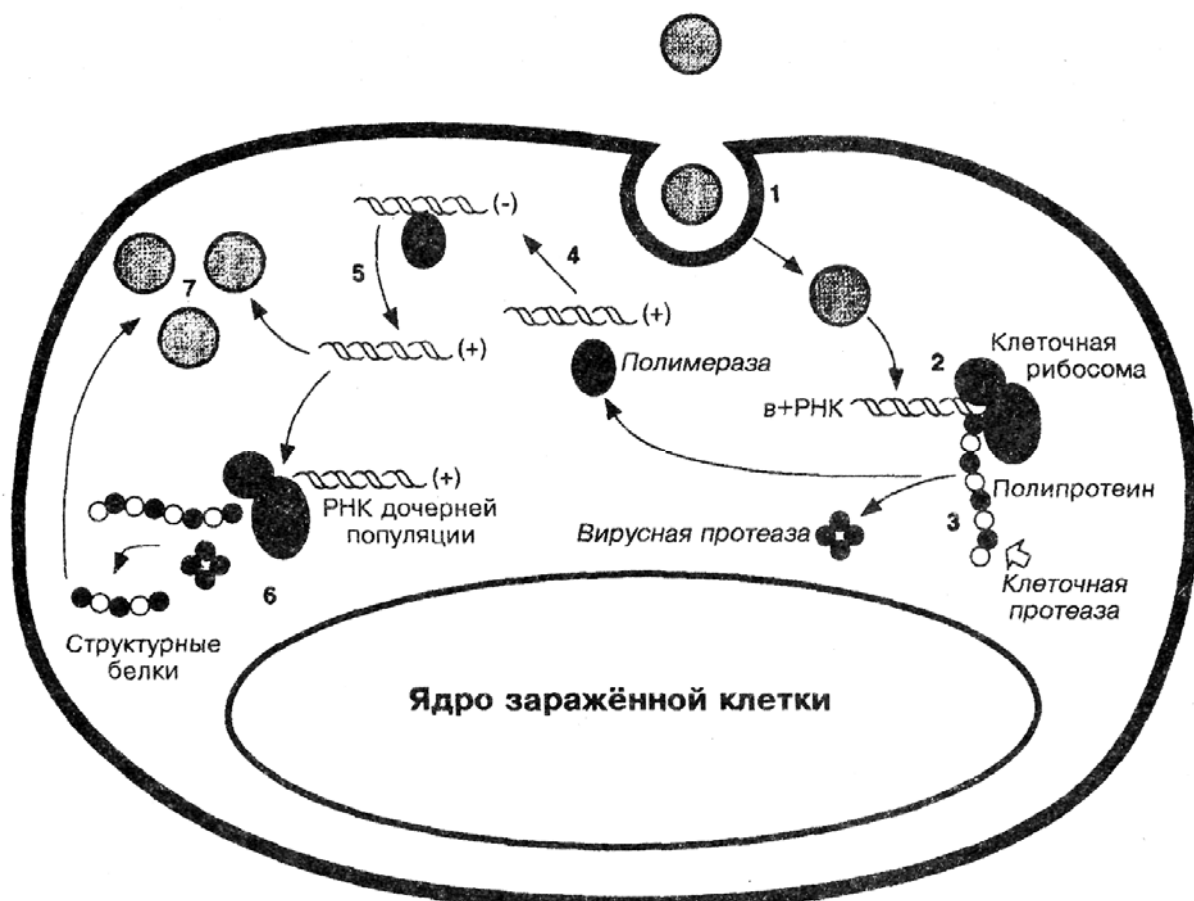
1 Вслед за адсорбцией, проникновением и депротенинизацией вирионов наступает *ранняя стадия* репродукции, во время которой синтезируются различные вирусные белки, в первую очередь *РНК-зависимая РНК-полимераза* (протеаза). Для объяснения репродукции полиовируса классическое определение *один ген - один полипептид*, идентичное понятию цистрон, практически непригодно. Геном содержит 5 генов, кодирует 4 белка, входящих в состав вирионов, и пятый белок, связанный с ферментами РНК-полимеразного комплекса.

1) РНК полиовируса мультигенная и моноцистронная, т.е. имеет только один локус для связывания рибосом и инициации синтеза полипептидов.

2) РНК полиовируса транслируется в *единичный гигантский полипептид* с М 200 000-300 000 Д – первичный продукт трансляции:

а) полипептид-предшественник посттрансляционно преобразуется в 12 полипептидов меньшего размера;

б) за специфическое разделение (через серию последовательных реакций) полипептида ответственны клеточные и вирусные протеазы (в том числе и РНК-зависимая РНК-полимераза);



После адсорбции вирус проникает в клетку посредством пиноцитоза (1). Репликативный цикл начинается после высвобождения вирусного генома в цитоплазме, т.к. молекулярная симметрия вирусной РНК (+РНК) аналогична мРНК и она может непосредственно распознаваться и транслироваться рибосомами (2). Клеточные протеазы трансформируют образующийся вирусный полипротеин (3) в РНК-зависимую РНК-полимеразу, вирусную протеазу и различные структурные белки. Полимераза копирует +РНК-цепь в виде -РНК (4), служащую матрицей для синтеза молекул +РНК (5), используемых в синтезе вирусных белков (6) либо входящих в состав генома дочерних популяций вирусов (7). (Из: Virella G. *Microbiology and infectious diseases*, 3rd ed, Williams & Wilkins, 1997.)

Рисунок 14 – Репликативный цикл +РНК-содержащих вирусов

в) учитывая вышеупомянутые противоречия, в генетику вирусов введено понятие – *шизон* (Купер, 1977) – участок генетической последователь-

ности, кодирующий полипептид, образующийся в результате посттрансляционного расщепления. Такой пептид обозначают *шизомер*, его границы определяют аминокислотная последовательность, конформация трансляционного продукта и активность клеточных протеаз, но не сигнал вирусного генома.

3) для определения генетической карты и функций всех полипептидов вириона часто используют *метод пактамицинового картирования*:

а) пактамицин ингибирует начальные этапы трансляции, но не влияет на удлинение молекулы белка;

б) для определения назначения генов в вирусном геноме применяют радиоактивные метки. В полипептид встраивают меченые аминокислоты и измеряют продолжительность синтеза каждой части полипротеиновой молекулы относительно времени начала её синтеза.

2 Поздняя стадия включает образование РНК. Репликация РНК начинается только после синтеза адекватных количеств РНК-полимераз и протекает в две стадии:

1) родительская нить РНК считывается в *минус-цепь* копии, количество которых строго контролируется;

2) минус-цепи служат матрицей для многократной транскрипции в *плюс-молекулы*, и их количество не контролируется.

3. Во время процесса «сборки» происходит созревание «пустых» капсидов и их связывание с молекулами вирусной РНК:

1) 5'-конец молекулы вирусной РНК ковалентно связывается со специфичным вирусным протеином (M_r 5000 Д);

2) пустой капсид полиовируса содержит полипептид-предшественник больших размеров (VP0), разделяющийся на конечные составляющие (VP2 и VP4) только после полного созревания вириона.

4. Высвобождение дочерних популяций сопровождается гибелью и лизисом инфицированной клетки.

3.7.1.2 Тогавирусы

Репликативный цикл тогавирусов мало отличается от такового у пикорнавирусов.

1 После *раздевания* вируса приблизительно 2/3 вирусной РНК транслируется в единичный протеин, впоследствии разделяющийся на функциональные единицы.

2 Вновь синтезированная вирусная полимераза трансформирует родительские плюс-цепи в минус-цепи, служащие основой для синтеза двух типов плюс-цепей. *Полная цепь* способна выполнять функцию шаблона для синтеза протеинов или функцию вирусной РНК. *Короткая цепь* составляет около трети полной цепи и кодирует структуру протеинов вирусного капсида, синтезируемых через образование полипротеина больших размеров.

3 Созревание тогавирусов включает формирование полного вириона с оболочкой путём почкования «голового» нуклеокапсида через вирусспецифические участки на клеточной оболочке (с захватом её фрагментов).

3.7.1.3 Ретровирусы.

Репродуктивный цикл ретровирусов уникален, т.к. при его реализации образуются промежуточные *продукты-интермедиаты ДНК* (рисунок 15). Поскольку обратная транскрипция и интеграция вирусного генома предшествуют репликации, то плюс-молекулы РНК ретровирусов *не проявляют инфекционных свойств*. Несколько молекул тРНК специфического акцепторного типа связано с вирусной РНК, очевидно, за счёт комплексообразования через водородные связи. Молекулы тРНК иницируют синтез комплементарной ДНК, протекающий на основе вирусной РНК сразу же после депротенизации.

1 *Обратная транскрипция*. Обратная транскриптаза вирионов индуцирует синтез ДНК, используя в качестве матрицы вирусную РНК; при считывании структуры +РНК в направлении 3'-5'-регионов образуется молекула-ДНК.

1) молекулы +ДНК копируются с синтезируемых молекул-ДНК с образованием двойных цепей, транспортирующихся в ядро клетки;

2) концевые последовательности +РНК дублируются, что приводит к образованию идентичных повторяющихся участков на концевых участках цепей вирусной ДНК. Их формирование играет важную роль в интеграции вирусной ДНК в ДНК клетки.

2 *Интеграция*. Вторичные ферменты, проявляющие эндонуклеазную и лигазную (интегразную) активности, вызывают сплайсинг клеточной ДНК с образованием рекомбинантных фрагментов с ДНК вирусов. Позднее под действием упомянутых ферментов, фрагменты образуют новую молекулу ДНК. Вирусная мРНК (как минимум, две различные матричные популяции) синтезируется из интегрированного ДНК-провируса.

3 *Транскрипция*. Вновь образованная молекула ДНК транскрибируется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой в +РНК-цепи. Образующаяся полная копия обладает следующими характеристиками:

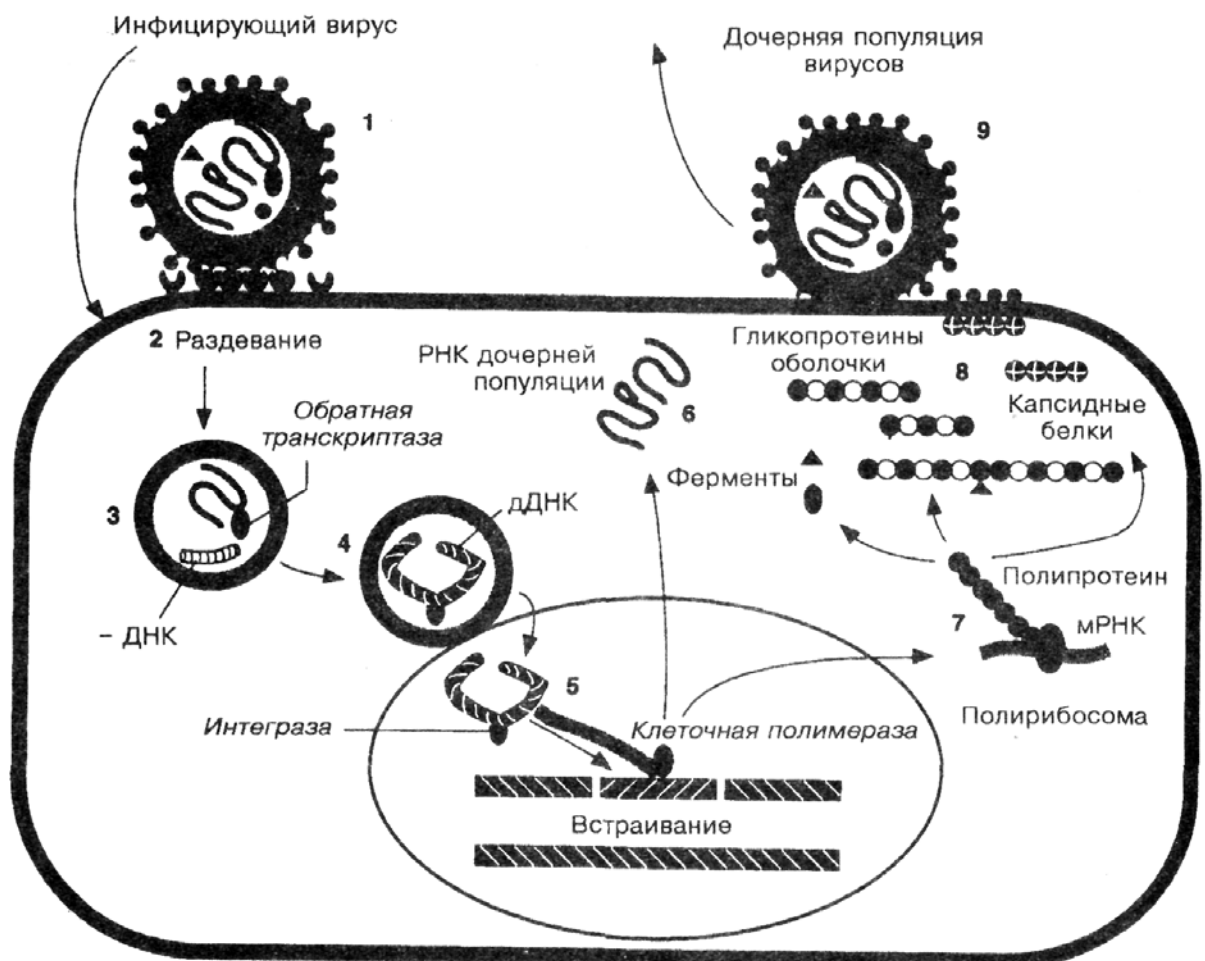
1) способна формировать геном дочерних популяций;

2) способна транслироваться как мРНК с образованием полипротеиновых молекул (позднее расщепляются и образуют структурные белки и ферменты, участвующие в сборке вирионов);

3) может быть подвергнута сплайсингу в малые молекулы мРНК, кодирующие поверхностные, регуляторные и добавочные белки;

4) несплайсированные полные копии РНК связываются с нуклеопротеинами сердцевин [протеины групповых Ag (gag)] и обычно отпочковываются от цитоплазматической мембраны в месте её замещения вирусными протеинами.

4 *Сборка и выход дочерних популяций*. Самосборка вирусов реализуется в цитоплазме, созревание вирусных частиц происходит на клеточной оболочке, откуда они отделяются почкованием (высвобождение вируса в окружающую среду может длиться годами).



Инфекционная вирусная частица (1) проникает в клетку посредством слияния с клеточной стенкой после адсорбции на ней. Затем вирус *разделяется* (2), а обратная транскриптаза (входит в состав вирусной частицы) индуцирует синтез -ДНК, используя в качестве матрицы молекулу РНК (3). +ДНК копируется с вновь синтезированной молекулы -ДНК, в результате чего образуется двойная цепь ДНК (дДНК) (4). дДНК транспортируется в ядро клетки, где клеточная ДНК подвергается сплайсингу с образованием рекомбинантов с вирусной ДНК (5). Интегрированная молекула ДНК транскрибируется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой в +РНК, используемую в качестве геномов дочерних популяций (6), а также транслируется как мРНК для синтеза (через стадию образования полипротеинов) структурных белков и ферментов (7). Некоторая часть +РНК подвергается сплайсингу с образованием мРНК малого размера, кодирующей поверхностные, регуляторные и добавочные белки (8). Зрелые дочерние популяции высвобождаются почкованием (9). (Из: Vireila G. *Microbiology and infectious diseases*, 3rd ed, Williams & Wilkins, 1997.)

Рисунок 15 – Репликативный цикл ретровирусов

3.7.2 Репликация РНК-вирусов с минус- и двойными цепями РНК

Репликация РНК-вирусов с минус- и двойными цепями РНК осуществляется по аналогичному принципу с небольшими отличиями. Для эффектив-

ного синтеза вирусных белков геном -РНК-содержащих вирусов трансформируется в молекулы +РНК (аналог мРНК), т.е. *вирусные иРНК синтезируются на геноме заражённой клетки*, что обусловлено действием РНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы). В нормальных клетках фермент отсутствует и синтезируется только заражёнными клетками, т.к. специфические полимеразы изначально входят в состав -РНК-содержащих вирусов (рисунок 16).

3.7.2.1 -РНК-цепи.

Среди -РНК-вирусов наиболее хорошо изучены рабдовирусы, парамиксовирусы и ортомиксовирусы. Геном рабдовирусов и парамиксовирусов не сегментирован, в то время как ортомиксовирусы содержат 8 отдельных молекул РНК. Все они имеют оболочку и обладают спиральной симметрией.

а. Адсорбция вирусов обусловлена взаимодействием со специфическими рецепторами на поверхности клеток.

б. Проникновение

1) рабдовирусы и ортомиксовирусы проникают в клетку посредством виропексиса с последующей депротенинизацией в фаголизосомах;

2) парамиксовирусы проникают в клетку посредством слияния с мембраной и освобождением от нуклеокапсида в цитоплазме.

в. Ранний период. Раздевание активирует РНК-зависимую РНК-полимеразу (транскриптазу), что обуславливает синтез мРНК. Шаблон для вирусной транскриптазы – весь вирусный нуклеопротеин, но не вирусная РНК отдельно. Потребность в вирусной транскриптазе делает невозможным выделение инфекционной РНК у РНК-содержащих вирусов.

1) в результате реализации ранних этапов образуются полные и короткие молекулы-копии (обычно в количестве пяти). Их дальнейшие превращения осуществляются в поздний период репродукции.

а) полные плюс-цепи образуются как матрицы молекул -РНК и в дальнейшем используются в качестве матрицы для синтеза РНК;

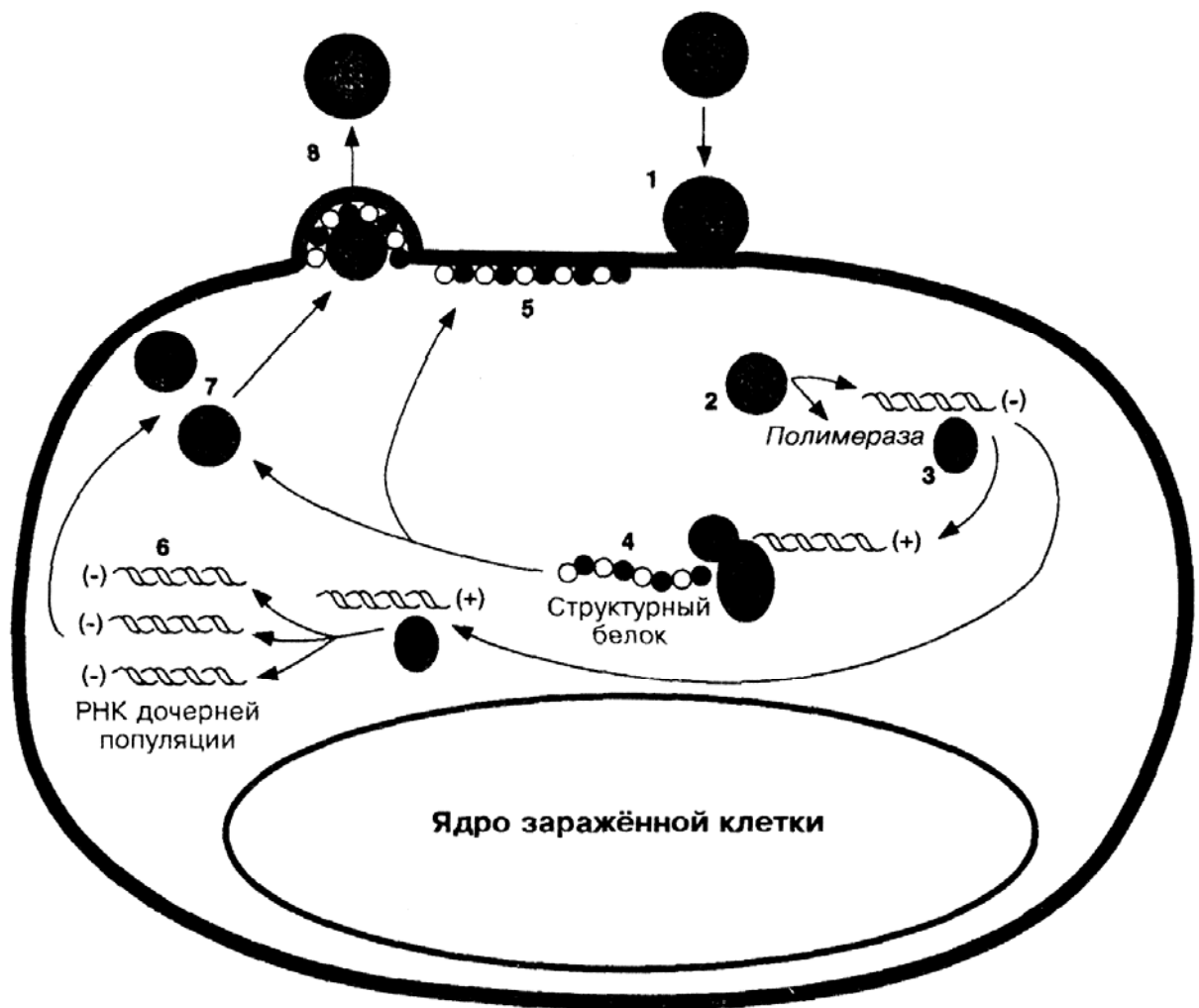
б) неполные копии содержат на 3'-конце полиадениловую кислоту и *кэпированы* на 5'-конце, их основная функция – выполнение роли мРНК для синтеза белков нуклеопротеина, поверхностных гликопротеинов и вирусной полимеразы.

2) транскрипция генома рабдовирусов и парамиксовирусов происходит только в цитоплазме.

3) транскрипция генома ортомиксовирусов достаточно уникальна, т.к. протекает в ядре инфицированной клетки.

а) транскрипция ортомиксовирусов требует наличия активной транскрипции в клетках хозяина, ингибируется актиномицином D и α -аманитином, угнетающими ДНК-зависимый синтез РНК;

б) для них необходимо наличие *кэпированных* молекул клеточной РНК как основы транскрипции вирусной мРНК.



Проникновение вируса осуществляется после адсорбции и слияния с клеточной оболочкой (1). После *раздевания* (2) вирусная -РНК трансформируется в плюс-цепь РНК-зависимой РНК-полимеразой, входящей в состав вириона (3), что приводит к образованию полных и коротких цепей. Короткие +РНК-цепи обуславливают синтез ферментов и белков для дочерних популяций (4), среди последних особую значимость имеет гликопротеин оболочки (5), встраивающийся в клеточную стенку на этапах, предшествующих отпочковыванию. Полная цепь +РНК служит матрицей для синтеза молекул -РНК дочерних популяций (6). Нуклеокапсиды (образуются из синтезированных белков) и -РНК прикрепляются к модифицированным участкам клеточной стенки (7), отщепляют фрагмент липидного слоя (что завершает процесс сборки) и отделяются почкованием (8). (Из: Virella G. *Microbiology and infectious diseases*, 3rd ed, *Williams & Wilkins*, 1997.)

Рисунок 16 – Репликативный цикл -РНК-содержащих вирусов

(1) Вирусы содержат транскриптазу (эндонуклеазу) и различные белки; фермент фрагментирует клеточную РНК, и образующиеся фрагменты связываются Р2-белком вируса.

(2) Сформировавшиеся комплексы кэпируются 5'-концом клеточной мРНК, связываются с 3'-окончаниями различных сегментов вирусной -РНК и

служат индуктором для вирусной транскриптазы. Последняя запускает транскрипцию коротких цепей, служащих матрицей для синтеза вирусных белков и ферментов.

г. Вторая ступень биосинтеза – образование вирусных белков, что происходит после связывания молекул мРНК с рибосомами.

1) Протеины вирионов синтезируются в молярных пропорциях, обнаруживаемых у интактных вирионов.

2) Контроль за соотношением вирусных полипептидов осуществляется в стадии транскрипции.

3) Геном оболочечных вирусов кодирует синтез нуклеопротеинов, формирующих нуклеокапсиды за счёт связывания с вирусной РНК, а также протеинов оболочки, синтезирующихся на рибосомах цитоплазматической мембраны и быстро встраивающихся в клеточную стенку.

4) Протеины оболочки гликозилируются во время синтеза и трансмембранного переноса.

5) Большинство спиккулярных гликопротеинов на поверхности вируса синтезируется через стадию гидрофобного проводника, имеющего значение при транспорте сквозь клеточную мембрану и элиминированного после приобретения спиккулярным протеином конечной конфигурации.

д. Белки вирусной оболочки заменяют нормальные протеины клеточной мембраны, формируя тем самым канал для вирусной оболочки на поверхности клетки.

е. Нуклеокапсид мигрирует к специфичным участкам на клеточной мембране.

1) Основа распознавания вирусспецифических участков – взаимодействие между нуклеопротеинами и протеинами клеточной оболочки.

2) Специфичность распознавания приводит к точному слиянию нуклеокапсида с мембраной.

ж. Зрелый вирус отпочковывается от поверхности клетки.

1) В различных типах клеток эффективность отпочковывания варьирует.

2) Отпочковывание не оказывает существенного влияния на целостность клетки.

3.7.3 Двухцепочечные РНК-вирусы

Они представлены семейством *Reoviridae* (рео- и ротавирусы). Все они лишены оболочки и обладают икосаэдральной симметрией. Основные отличия репликативного цикла от -РНК-содержащих вирусов:

а. Образующаяся мРНК не содержит концевой полиА 3'-группировки;

б. Родительская РНК остаётся связанной с протеинами вириона в форме субвирусной частицы;

в. Синтез мРНК, инициированный вирусной полимеразой, протекает в течение нескольких часов до появления новой двухцепочечной молекулы;

г. В отличие от ДНК-подобного механизма прямой двухцепочечной репликации, молекулы РНК синтезируются в комплексе с РНК-протеином за счёт образования комплементарной цепи;

д. Вирусы высвобождаются в цитоплазму и не отпочковываются с клеточной поверхности.

3.7.3.1 ДНК содержащие вирусы.

Репликативный цикл включает раннюю и позднюю фазы (рисунок 17). У крупных ДНК-вирусов отмечают явное несоответствие между кодирующей ёмкостью генома и молекулярной массой вирусиндуцированных белков и белков, входящих в состав вирионов; например, у герпетовирусов белки вирионов и их предшественники кодируют лишь 15% ДНК. Возможно, большая часть генома занята генами, кодирующими синтез ферментов и регуляторных белков. Для большей части подобных вирусов (например, папова-, адено- и герпетовирусов) характерна аналогия основных принципов репликации, в то время как репродукция поксвирусов имеет некоторые отличительные особенности.

1 *Ранняя фаза.* Вирусная ДНК диффундирует в ядро клетки, подвергается воздействию клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы, что запускает её транскрипцию. При этом считывается и транслируется часть вирусного генома, в результате чего синтезируются *ранние белки* (регуляторные, матричные протеины и вирусные полимеразы).

а. Регуляторные белки выполняют различные функции.

1) В случае классической литической инфекции они блокируют синтез РНК, ДНК и белка в клетке и одновременно осуществляют экспрессию вирусного генома, изменяя специфичность реагирования клеточных полимераз и полирибосом.

2) Регуляторные белки запускают репликацию клеточной ДНК, модифицированной встроенными геномами ДНК-содержащих и ретровирусов, т.е. репликацию вирусных геномов.

б. В репликацию вирусных геномов также вовлечены вирусспецифические полимеразы, участвующие в образовании молекул ДНК дочерних популяций.

в. Матричные белки служат основой для репликации нуклеиновых кислот и сборки дочерних популяций. Образуют электроно-плотные скопления в клетке, известные как *тельца включений*.

2 *В поздней фазе* реализуется синтез нуклеиновых кислот вируса, обусловленный действием полимераз. Однако не вся образующаяся ДНК упаковывается в вирионы дочерней популяции, часть её используется для синтеза поздних белков (необходимых для сборки), обусловленного действием вирусных или модифицированных клеточных полимераз.

а. Транскрипция мРНК для полной копии вирусной ДНК в поздний период определена несколькими механизмами; все они своим следствием имеют распознавание полимеразой начальной и окончательной стадий реплика-

тивного цикла, в ходе которых синтезируются вирусные белки. Эти механизмы включают:

- 1) последовательную модификацию ДНК-зависимых РНК-полимераз;
- 2) синтез вирусспецифических ДНК-зависимых РНК-полимераз;
- 3) регуляцию активности ранних белков; некоторые из них способны выполнять функции факторов транскрипции с аффинитетом к участкам ДНК (с которыми связывается РНК-полимераза), ответственным за запуск транскрипции.

б. В соответствии с типом нуклеиновой кислоты вируса для синтеза структурных белков существуют следующие закономерности:

- 1) у *голых* вирусов синтезируются только капсидные белки;
- 2) у *одетых* вирусов образуются белки капсида и гликопротеины оболочки.

3. Паповавирусы и аденовирусы

а. Репликативный цикл включает раннюю и позднюю фазы.

1) В течение каждой фазы различные участки вирусного генома транскрибируются п

2) Обе фазы разграничивает начало репликации вирусной ДНК.

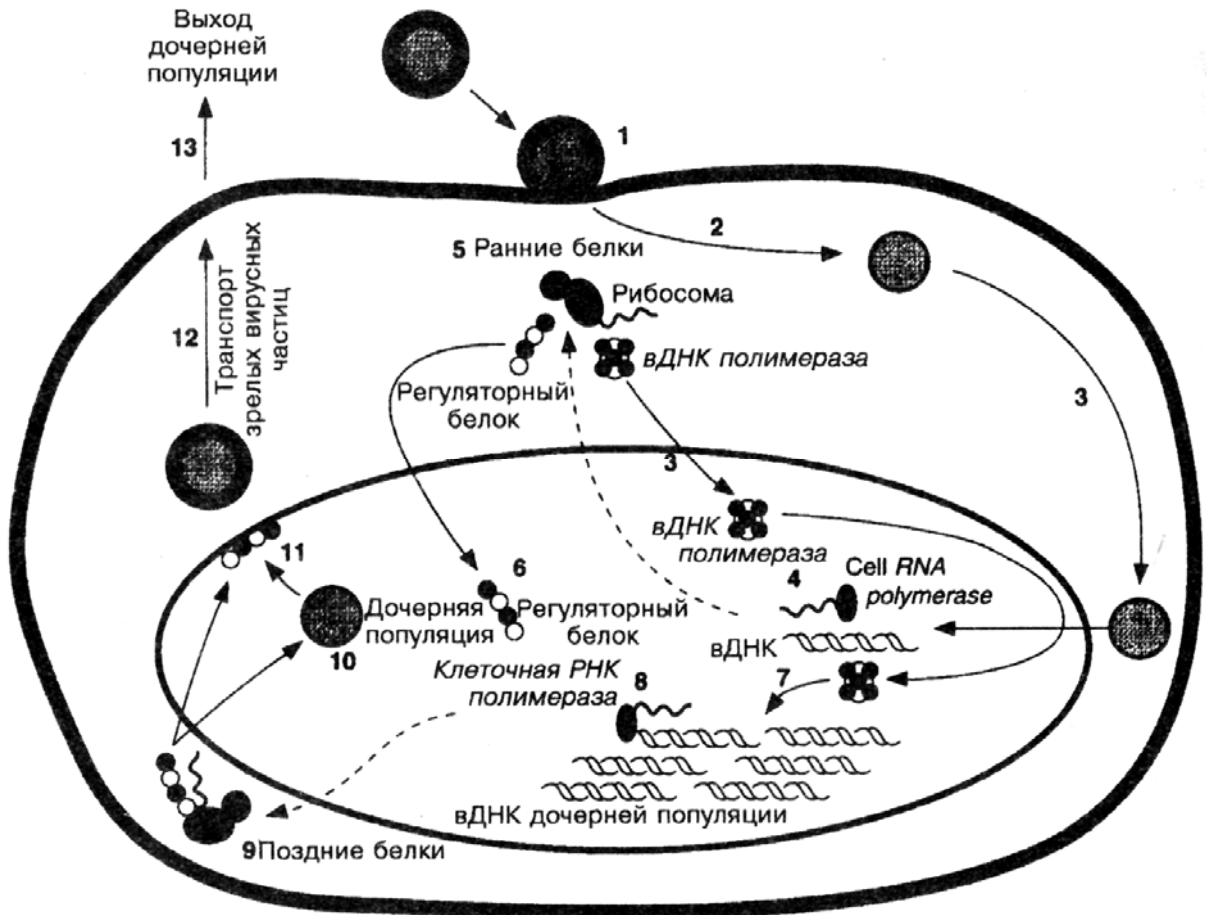
3) Адсорбция, проникновение и депротенинизация аналогичны таковым у РНК-содержащих вирусов, однако *депротенинизация всегда протекает в ядре, а не в цитоплазме.*

б. Ранняя фаза. Вирусная ДНК диффундирует в ядро клетки, где иницируется её транскрипция под действием клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы и запускается синтез мРНК. *Механизмы транскрипции* вирусной ДНК аналогичны считыванию информации с клеточной ДНК, при этом образуются транскрипты больших размеров, формирующиеся, очевидно, через сплайсинг РНК в функциональные молекулы мРНК. В ранние этапы транскрипции вовлекается комплекс генов, действующих либо в качестве молекулярных регуляторов, контролирующих экспрессию поздних генов, либо в качестве естественных ферментов при репликации вирусной ДНК. Основные данные по изучению механизмов регуляции экспрессии генов ДНК-вирусов были получены при использовании бактериальных эндонуклеаз (рестриктаз) в качестве геномной метки.

1. Паповавирусы. В течение первых 14-18 ч гены *A, H, In B* (составляют 50% всей ДНК) транскрибируются в три предшественника мРНК (отличаются незначительно); последние трансформируются (через сплайсинг, кэпирование 5'-окончаний и поли-аденилирование 3'-окончаний) в мРНК для трёх регуляторных белков [трансформирующие (Т) Ag], контролирующих дифференцировку клеток. Позднее эти белки воздействуют на репликативные механизмы, ингибируя синтез ранних генов (тем самым запуская реакции поздней фазы).

2. Аденовирусы. В течение первых 8 ч клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза II запускает синтез вирусных структур. При этом считывается только 30% генома, транскрипты трансформируются (через сплайсинг, кэпирование, полиаденилирование) в мРНК; цель подобных превращений – син-

тез регуляторных белков. Гены *E1A* и *E1B* кодируют белки, активирующие экспрессию вирусного генома и клеточную пролиферацию. Ген *E2A* кодирует ДНК-полимеразу и ДНК-связывающий белок, выполняющий роль праймера в синтезе ДНК. Ген *E3* кодирует белок, связывающийся с Аг комплекса гистосовместимости I класса (МНС-I) и понижающий «антигенность» инфицированных клеток. Ген *E4* кодирует синтез белков, контролирующих образование вирусной и клеточной ДНК.



В качестве примера представлены этапы репродукции вируса герпеса. После адсорбции (1) вирус проникает в клетку путём слияния с мембраной (2), нуклеокапсид транспортируется к ядерной оболочке (3), и вирусная ДНК (вДНК) попадает в ядро, где начинается её транскрипция (4). В результате трансляции «ранней порции» вирусного генома синтезируются ранние белки (5), включая регуляторные протеины, вирусные полимеразы и матричные белки. Вирусная полимераза проникает в геном клетки (6), где запускает синтез молекул ДНК дочерних популяций (7). Часть вирусной ДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой (8), что индуцирует синтез поздних белков (9), необходимых для сборки дочерних популяций (10); последние покидают ядро, отпочковываясь от его мембраны (11) и включая её фрагменты в состав своей оболочки. Зрелые вирионы транспортируются через цитоплазму и покидают клетку через комплекс *Гдльджи* либо посредством рециклизации. (Из: Virella G. *Microbiology and infectious diseases*, 3rd ed, *Williams & Wilkins*, 1997.)

Рисунок 17 – Репликативный цикл ДНК-содержащих вирусов

в. *Синтез ДНК* начинается сразу же после окончания формирования ранних генов (при условии наличия ферментов, необходимых для инициации синтеза ДНК).

1) При нелитическом цикле репликации (трансформации) как для паповавирусов, так и для аденовирусов характерно появление только ранних генов, изменяющих регуляцию экспрессии генов в клетках хозяина.

2) Механизм синтеза дочерней вирусной ДНК варьирует среди различных ДНК-вирусов в зависимости от размера и структуры вирусного генома.

3) Вновь синтезированная ДНК структурно отличается от родительской молекулы, поэтому служит подходящей основой для позднего синтеза.

г. *В течение поздней фазы активно транскрибируется участок ДНК*, синтезированный в ранней фазе. Поздняя транскрипция похожа на раннюю клеточную транскрипцию с активным сплайсингом транскриптов. Во время поздней фазы образуются такие продукты, как протеины капсида, вовлекающиеся в процесс формирования новых вирусных частиц. Данную фазу, как и раннюю, характеризует то, что некоторые вирусы используют одни и те же последовательности ДНК для синтеза более одного гена. Транскрипты поздней мРНК транспортируются в цитоплазму, где используются для синтеза поздних генов. Поздние гены транспортируются обратно в ядро либо в мембрану ядра, где преобразуются в новые вирусные частицы.

1) У паповавирусов считываются гены *C, D, E, K, F, J* и *G* с последующим образованием трёх типов мРНК для синтеза VP1, VP2 и VP3 белков капсида. Если чувствительная клетка полностью перmissive (т.е. репродукция вируса не вызывает существенных нарушений метаболизма), то происходит реинтеграция генома вируса, и он реплицируется автономно.

2) У аденовирусов в позднюю фазу синтезируется (под действием вирусной ДНК-полимеразы) ДНК дочерних популяций. Последняя имеет различный аффинитет к клеточным РНК-полимеразам, способным транскрибировать как полный вирусный геном, так и структуру поздних белков. Одни и те же сегменты ДНК могут быть считаны различным образом, т.к. участки, запускающие или ограничивающие транскрипцию, диффузно разбросаны по всему геному. Подобное варьирование в транскрипции ДНК характерно и для других вирусов (например, ретровирусов). Аналогичный механизм позволяет синтезировать различные белки из ограниченной генетической информации за счёт считывания структуры РНК-транскриптов в различных направлениях.

д. *Формирование капсида и созревание вирусной частицы* происходит в ядре. Паповавирусы и аденовирусы высвобождаются посредством лизиса поражённой клетки.

4. *Герпетовирусы*. Основные отличия репликативного цикла опосредует более сложная структура генома. Адсорбция на клетки реализуется через специфические рецепторы, вирусы проникают в клетку посредством слияния оболочки с клеточной мембраной с высвобождением нуклеокапсида в цито-

плазму; ДНК мигрирует в ядро, *раздевание* вирусного генома происходит в порах ядерной мембраны.

а. Транскрипция включает раннюю и позднюю фазы, однако они разграничиваются достаточно нечётко; на этапах синтеза образуются различные транскрипты трёх классов (α , β и γ), задействованных в обеих фазах репродукции.

б. В ранней фазе синтезируются ранние белки, кодируемые проксимальной третью вирусного генома; они проявляют регуляторные свойства, включая трансактивацию транскрипции других участков генома, кодирующих ДНК-полимеразу и ДНК-связывающий белок.

в. Сборка дочерних популяций осуществляется в ядре, где капсидные белки окружают молекулы ДНК, формируя нуклеокапсиды. Финальная стадия морфогенеза герпетовирусов – формирование оболочки (на внутренней поверхности ядерной мембраны). Зрелые дочерние популяции отпочковываются от модифицированной ядерной мембраны, транспортируются через цитоплазму и выделяются наружу посредством рециклизации или через мембрану пузырьков комплекса *Гольджи*.

г. В позднюю фазу вирусная ДНК-полимераза индуцирует репликацию ДНК, часть которой составляют геномы дочерней популяции, а другую считывают клеточные полимеразы, что вызывает экспрессию концевых генов, кодирующих структурные протеины (белки оболочки и гликопротеины шипов).

5. Поксвирусы. По сравнению с прочими вирусами животных поксвирусы обладают наиболее сложным репродуктивным циклом с образованием более 100 различных белков, входящих в состав вирионов (большинство образует наружную оболочку). Репродукция поксвирусов по-своему уникальна и включает два основных аспекта:

1) *репликация осуществляется только в цитоплазме и полностью независима от клеточных полимераз*, т.к., в отличие от прочих вирусов, поксвирусы содержат собственную ДНК-зависимую РНК-полимеразу (обеспечивает считывание более половины вирусного генома в течение начальной и ранней стадий);

2) *транскрипция ДНК начинается до полной депротеинизации вируса*, т.к. она полностью обусловлена активностью вирусных полимераз. В репродуктивном цикле выделяют три отдельные стадии – начальную, раннюю и позднюю.

а. Начальная стадия запускается сразу же после *раздевания* вируса и включает синтез протеазы, обеспечивающей депротеинизацию сердцевин вируса. Свободная ДНК попадает в цитоплазму и инициирует формирование цитоплазматических включений, выполняющих функцию центров для репликации и сборки вируса.

б. Ранняя стадия – транскрибируется примерно половина вирусной ДНК.

1) Образуются ферменты, кодируемые ранними генами и участвующие в репликации вирусной ДНК.

2) Параллельно в небольшом количестве образуются структурные белки.

в. Поздняя стадия совпадает с началом репликации ДНК (что переключает механизмы транскрипции на считывание второй половины генома).

1) Регуляторные белки блокируют трансляцию ранней мРНК и запускают считывание и синтез поздних (структурных) белков.

2) Сборка вирионов осуществляется только в цитоплазме посредством реакций мембранного синтеза.

3) Высвобождение зрелых популяций сопровождается лизисом клетки.

б. Вирус гепатита В неспособен размножаться *in vitro*, и некоторые этапы его репродукции остаются плохо изученными. Геном представлен двухцепочечной молекулой ДНК, но плюс-нить несколько короче, каждая заканчивается одинаковыми двойными сегментами, обеспечивающими интеграцию в геном клетки. Вирионы содержат полимеразу, способную транскрибировать ДНК и РНК.

а. После раздевания вирусные ДНК и полимеразы мигрируют в ядро, где под действием последней осуществляется *дополнение плюс-цепи ДНК* (в качестве матрицы используется минус-цепь).

б. Полная двухцепочечная ДНК транскрибируется с образованием небольших молекул мРНК и полной молекулы +РНК (прегеномная РНК, служит матрицей для репликации генома). *Возможно считывание генома на трёх различных основах*, в результате чего образуются мРНК, кодирующие различные вирусные ферменты и белки.

в. Репликация генома осуществляется через ряд последовательных процессов.

1) Прегеномная +РНК инкапсулируется в сердцевину вириона, содержащую полимеразу; фермент действует как обратная транскриптаза и транскрибирует -ДНК, используя +РНК как матрицу (позднее она разрушается).

2) Затем -ДНК используется как матрица для транскрипции +ДНК, однако процесс носит незавершённый характер и заканчивается образованием двойной молекулы с неполной плюс-цепью.

г. Сборка вирионов оканчивается формированием оболочки, включающей специфический *поверхностный Ag (HB_sAg)*.

д. Интеграция. Одновременно с реализацией сложного репликативного цикла вирусная ДНК интегрируется в геном клетки и расщепляется на множество фрагментов, встраивающихся в различные участки клеточной ДНК. После встраивания доступным для считывания остаётся лишь фрагмент, кодирующий HB_sAg, что даёт ему возможность реплицироваться даже при отсутствии возможности для полной репродукции вируса.

4 Генетика вирусов

Величайшие достижения середины XX века – открытие дискретных единиц наследственности (генов), разработка хромосомной теории наследственности, развитие биохимической генетики микроорганизмов и установление принципа «один ген – один белок», открытие регуляции активности генов прокариотов Ф. Жакобом и Ж. Моно, открытие двойной спирали ДНК Дж. Уотсоком и Ф. Криком и др. создали основу для превращения генетики классической в генетику молекулярную, где законы наследственности и изменчивости изучаются на молекулярном и субмолекулярном уровнях.

4.1 Структурная организация генома клетки

В составе генома имеются структурные гены, кодирующие определенные биополимеры (белки или РНК), и регуляторные гены, которые контролируют функцию структурных генов. Регуляция происходит с помощью белковых продуктов регуляторных генов – репрессоров, подавляющих активность структурных генов. Регуляторными участками генов, контролирующими транскрипцию, являются усилитель транскрипции (*enhancer*) и промотор – область, предшествующая структурным генам и определяющая место специфического связывания РНК-полимеразы.

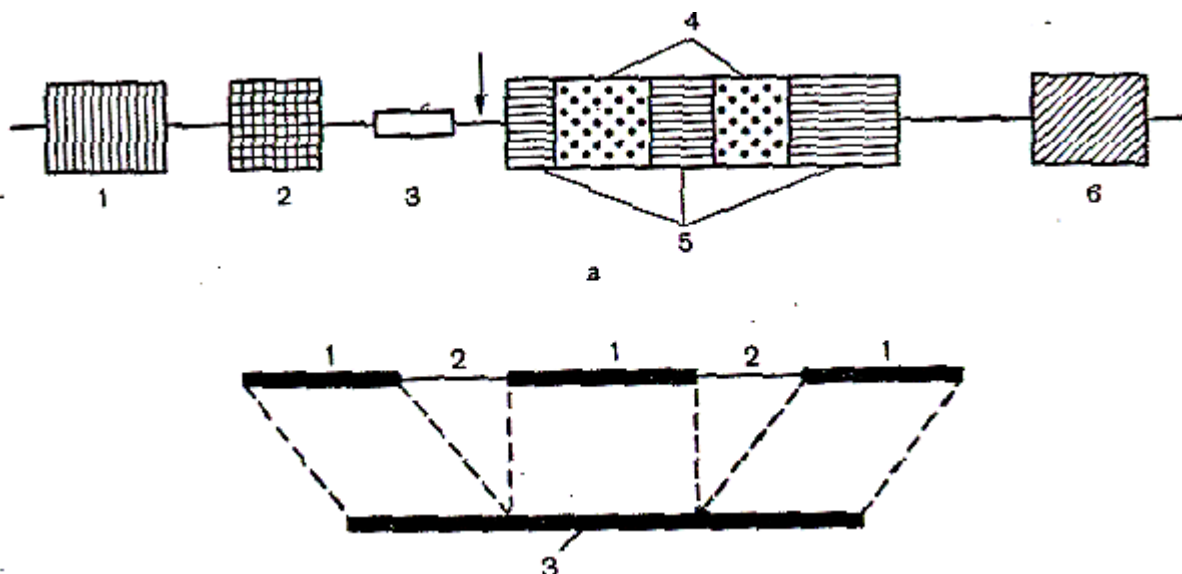
Характерной особенностью генов эукариотической клетки является их мозаичная структура, т.е. прерывистость гена. В составе гена, кодирующего один белок, кодирующие участки прерываются вставочными последовательностями, которые не несут никакой кодирующей информации и не транслируются. Кодирующие участки гена называются экзонами, а вставки – интронами (рисунок 18).

При транскрипции считывается весь ген, включая экзоны и интроны. Впоследствии происходит созревание (процессинг) иРНК: из образовавшегося длинного первичного транскрипта удаляются участки, соответствующие интронам, а участки, соответствующие экзонам, «сшиваются». В результате подобной модификации из первичного транскрипта образуется зрелая иРНК. Этот процесс вырезания интронов и сшивания экзонов называется сплайсингом (от английского слова *splice* — соединять, сращивать концы каната).

Сплайсинг был впервые описан на модели ДНК-содержащих вирусов животных – SV40 и аденовирусов.

В геноме эукариотов наряду с уникальными содержатся и повторяющиеся гены (гены рибосомных и тРНК и гистонов). Как и у прокариотов, в большом количестве обнаружены короткие и более длинные повторяющиеся нуклеотидные последовательности, которые обладают способностью перемещаться по геному, они названы «прыгающими генами», транспозонами, или мобильными диспергированными генами. В состав этих генов входят сигнальные последовательности, перемещение которых может резко ускорять транскрипцию соседних генов. Открытие мобильных диспергированных

генов изменило, наши представления о геноме как аппарате со стабильной и постоянной структурой и свидетельствует о его гибкости и пластичности, не исключающих создания новых генов и генных семейств.



а – строение эукариотического гена SV4D; 1 – усилитель транскрипции; 2 – промотор; 3 – инициация репликации ДНК вируса (origin); 4 – нитроны; 5 – экзоны (кодирующие области гена); 6 – терминирующая последовательность ААТAAA; стрелка обозначает участок начала транскрипции, б – схема сплайсинга при созревании иРНК: 1 – экзоны, 2 – нитроны, 3 – зрелая иРНК.

Рисунок 18 - Строение эукариотического гена и его транскрипция

4.2 Структурная организация генома вируса

Вирусы являются одним из любимых объектов молекулярной генетики благодаря простому строению и малой молекулярной массе их геномов, которая в 10^6 раз меньше массы генома эукариотической клетки. Организация генетического аппарата у ряда вирусов, например у SV40, настолько сходна с таковой генов эукариотической клетки, что получила название минихромосомы. Минихромосома широко используется для изучения организации и репликации ДНК.

Число генов у вирусов значительно варьирует: от 3-4 генов у просто устроенных вирусов (парвовирусы) до 150 генов и больше у сложно устроенных (вирус оспы). Геном вирусов животных является гаплоидным, за исключением ретровирусов, которые имеют диплоидный геном, представленный двумя идентичными молекулами РНК. У вирусов с фрагментарным геномом (вирусы гриппа, реовирусы) каждый фрагмент обычно представляет собой один ген.

Так же, как и геном эукариотической клетки, ДНК-геном ряда вирусов животных имеет мозаичную структуру, при которой смысловые последовательности чередуются с неинформативными последовательностями. Механизм сплайсинга при формировании иРНК широко распространен и среди

вирусов, имеющих ядерную локализацию транскрипции (адено-, папова-, герпесвирусы), поскольку ферменты, осуществляющие сплайсинг, находятся в ядре. Однако сплайсинг был обнаружен и у РНК-содержащих вирусов. Например, у вирусов гриппа происходит сплайсинг транскриптов 7-го и 8-го генов; в результате сплайсинга и сдвига рамки трансляции продуктами каждого из этих генов являются по два уникальных белка.

В составе генов ДНК-содержащих вирусов есть регуляторные участки, в том числе промотор, контролирующие функцию структурных генов. Сильными промоторами являются концы многих вирусных ДНК, представляющие собой длинные концевые повторы, сильный промотор имеют гены тимидинкиназы вирусов оспы и герпеса. Эти промоторы используются в генной инженерии для усиления транскрипции изучаемого гена.

4.3 Способу увеличения информационной емкости вирусного генома

В отличие от полицистронных иРНК прокариотов, иРНК эукариотов являются моноцистронными, т.е. реализуется принцип «один ген – одна молекула иРНК – один белок». Однако у некоторых клеточных иРНК и часто у вирусных иРНК этот принцип нарушается, и иРНК может направлять синтез двух белков.

У многих вирусов молекулярная масса синтезирующихся белков превышает теоретически рассчитанную. Этот феномен объясняется наличием у вирусов механизмов, позволяющих получить развернутую генетическую информацию при максимальной экономии генетического материала; подобные механизмы выработаны в процессе эволюции вирусов как генетических паразитов.

Способами увеличения генетической информации являются: 1) двукратное считывание одной и той же иРНК, но с другого иницирующего кодона; 2) сдвиг рамки трансляции; 3) сплайсинг; 4) транскрипция с перекрывающихся областей ДНК и др.

В составе иРНК обычно встречается несколько иницирующих кодонов. В соответствии с принятой в настоящее время гипотезой «сканирующей модели» малая рибосомальная субъединица связывается с иРНК около 5'-конца и скользит вниз до встречи с иницирующим кодоном. Однако инициация в большинстве случаев происходит не с первого иницирующего кодона, а с последующих АУГ-кодонов. «Правильный» функционирующий АУГ-кодон узнается рибосомой благодаря окружающим его последовательностям («фланкирующим нуклеотидам»). В том случае, если первый иницирующий кодон находится в менее благоприятном окружении, чем последующие АУГ-кодоны, большинство малых рибосомальных субъединиц пройдут этот кодон и начнут инициацию трансляции с последующих АУГ-кодонов, однако некоторые субъединицы начнут инициацию с первого АУГ-кодона. В этом случае одна иРНК может направить синтез двух белков раз-

ной длины. Такие иРНК имеются у многих вирусов: SV40, герпеса, аденовирусов, буньявирусов, реовирусов и др.

Трансляция может происходить без сдвига рамки и со сдвигом рамки. Генетический код является триплетным, это означает, что три нуклеотида, составляющих триплет, или кодон, кодируют одну аминокислоту. В том случае, если триплеты сохранены и генетический код не изменился, то при трансляции с двух разных иницирующих кодонов будут синтезироваться полипептиды, представляющие собой укороченную копию первого полипептида (трансляция без сдвига рамки).

В том случае, если произошел сдвиг на один или два нуклеотида, образуются новые триплеты (кодоны) и появляется новый генетический код. В этом случае одна молекула иРНК может транслироваться с образованием двух уникальных белков, т.е. таких белков, у которых нет идентичных аминокислотных последовательностей.

Сплайсинг со сдвигом рамки широко используется у ряда вирусов (вирусы гриппа, парамиксовирусы, буньявирусы, аденовирусы, паповавирусы, парвовирусы и др.). Например, все три иРНК аденоассоциированного вируса образуются при транскрипции одного гена и имеют общий 3'-конец, самая короткая иРНК образуется путем сплайсинга и транслируется с образованием трех структурных белков, остальные две иРНК транслируются с образованием неструктурных белков. В результате сплайсинга и сдвига рамки иРНК 7-го и 8-го генов вируса гриппа транслируются с образованием двух белков: полипептидов M_1 и M_2 (продукты 7-го гена) и NS_1 и NS_2 (продукты 8-го гена). Белки NS_1 и NS_2 имеют лишь первые 10 идентичных аминокислот, а затем – уникальные аминокислотные последовательности. Один и тот же ген парамиксовирусов (вирус Сендай) кодирует два уникальных белка: структурный белок Р и неструктурный белок С.

Одним из способов экономии генетического материала является нарезание полипептида-предшественника на участки разной длины, в результате чего образуются разные полипептиды с перекрывающимися аминокислотными последовательностями. Подобный механизм нарезания имеет место у аденоассоциированных вирусов и у SV40.

Таким образом, число реальных генов превосходит молекулярную массу генома. Основанный на длине генома расчет числа генов неизменно приведет к ошибочным результатам. Более точные представления о числе генов можно получить путем биохимического и генетического анализов.

В результате перекрывания генов и сдвига рамки трансляции «размываются» границы генов, и понятие «ген» в известном смысле утрачивает первоначальное значение как дискретный фрагмент генома и приобретает скорее функциональное значение.

4.4 Основные процессы, контролирующие наследственность и изменчивость вирусов

Модификации. Модификациями называются не наследуемые (фенотипические) изменения у вирусов, обусловленные клеткой-хозяином. Эти изменения лежат в основе адаптации вируса к новому хозяину и преодоления зависимо от хозяина ограничения. Модификации нуклеиновых кислот вирусов осуществляют клеточные ферменты, ответственные за ограничение (рестрикцию) репродукции вируса.

Мутации. В основе изменчивости вирусов лежат мутации, т.е. изменения состава и последовательностей нуклеотидов вирусного генома. Мутации происходят у всех вирусов, независимо от того, является ли их генетическим аппаратом ДНК или РНК. В результате мутаций отдельные вирионы могут приобретать новые свойства. Дальнейшая судьба таких вирусов зависит от естественного отбора, сохраняющего популяцию, наиболее приспособленную к условиям существования.

Мутации могут иметь разные последствия. В одних случаях они ведут к изменению фенотипических проявлений в нормальных условиях. Например, увеличивается или уменьшается размер бляшек под агаровым покрытием; увеличивается или ослабляется нейровирулентность для определенного вида животных; вирус становится более чувствительным к действию химиотерапевтического агента и т.п.

В других случаях мутация является летальной, так как вследствие ее нарушается синтез или функция жизненно важного вирусспецифического белка, например вирусной полимеразы.

В некоторых случаях мутации являются условно летальными, так как вирусспецифический белок сохраняет свои функции в определенных, оптимальных для него, условиях и теряет эту способность в неразрешающих (непермиссивных) условиях. Типичным примером таких мутаций являются температурно-чувствительные (temperature sensitive) – ts-мутации, при которых вирус теряет способность размножения при повышенных температурах (39-42 °С), сохраняя эту способность при обычных температурах выращивания (36-37 °С).

По своему механизму мутации могут быть тоже разными. В одних случаях происходит деления, т.е. выпадение одного или нескольких нуклеотидов, в других случаях происходит встраивание одного или нескольких нуклеотидов, а в некоторых случаях – замена одного нуклеотида другим.

Мутации могут быть прямыми и обратными. Прямые мутации меняют фенотип, а обратные мутации – реверсии – его восстанавливают. Возможны истинные реверсии, когда обратная мутация происходит в месте первичного повреждения, и псевдореверсии, если мутация происходит в другом участке дефектного гена (интрагенная супрессия) или в другом гене (экстрагенная супрессия). Реверсия не является редким событием, так как ревертанты обычно более приспособлены к данной клеточной системе. Поэтому при по-

лучении мутантов с заданными свойствами, на пример вакцинных штаммов, приходится считаться с возможной их реверсией к дикому типу.

Мутации носят случайный характер и объясняются статистическими законами.

В качестве физических мутагенов наиболее часто применяется ультрафиолетовое облучение, так как его энергия сопоставима с энергией химических связей. Реже применяются более жесткие виды облучения – рентгеновское и γ -облучение, а также обработка вирусных суспензий нейтронами, протонами, электронами и ядрами гелия, так как они вызывают сильные разрушения вирусных геномов и их инактивацию.

В качестве химических мутагенов применяют аналоги оснований (бромурацил, бромдезоксисуридин, 2-аминопурин, нитрозогуанидин и пр.), алкилирующие и флуоресцирующие соединения (профлавин), интеркалирующие агенты (актиномицин, этидий бромид), азотистую кислоту, гидроксилламин и многие другие.

4.5 Генетические и негенетические взаимодействия между вирусами

Как в естественных, так и в экспериментальных условиях одна клетка может быть заражена не одним, а несколькими вирусами. В процессе такой смешанной инфекции могут иметь место различные формы взаимодействия как между вирусными геномами, так и между продуктами генов. При взаимодействии геномов могут наблюдаться такие формы генетических взаимодействий, как множественная реактивация, рекомбинация, пересортировка генов, кросс-реактивация, гетерозиготность. При взаимодействии на уровне продуктов генов могут иметь место негенетические взаимодействия: комплементация, интерференция, фенотипическое смешивание и др.

Множественная реактивация. Вирусная инфекция может возникнуть при заражении клетки несколькими вирионами с поврежденными геномами вследствие того, что функцию поврежденного гена может выполнять вирус, у которого этот ген не поврежден. Этот феномен был вначале обнаружен на бактериофагах и получил название множественной реактивации. В основе множественной реактивации лежит кооперативный процесс, при котором вирионы с поражением разных генов дополняют друг друга путем генетической рекомбинации, в результате чего репродуцируется исходный неповрежденный вирус.

Эффективность множественности реактивации зависит от многих причин: степени повреждения генома вирионов, числа проникших в клетку вирионов, концентраций их в определенных участках клетки, аутоинтерференции поврежденных вирионов. Для множественной реактивации важное значение имеет расстояние между вирионами с поврежденными геномами внутри клетки. Обработка вирионов двухвалентными ионами металлов, ведущая к их агрегации, усиливает множественную реактивацию.

Рекомбинация. Генетической рекомбинацией называют обмен генетическим материалом, происходящий между родительскими вирусами. Возможен обмен полными генами (межгенная рекомбинация), так и участками одного и того же гена (внутригенная рекомбинация). Образующийся вирус-рекомбинант обладает свойствами, унаследованными от разных родителей.

Обычно рекомбинируемые штаммы обладают характерными признаками, которые обозначаются как маркеры. Например, были получены рекомбинанты между вирусами полиомиелита, обладающие повышенной устойчивостью и повышенной чувствительностью к гуанидину, разной нейровирулентностью, разной устойчивостью к повышенной температуре, разной чувствительностью к ингибиторам сывороток лошадей и коров и т.п. Для получения рекомбинантов используют штаммы, содержащие два или большее число маркеров.

Тест рекомбинации применяют для генетических исследований вирусов. С его помощью возможно построение генетических карт вирусов, в которых определяется, в каких участках генома произошли мутации, а также в условных единицах измеряется расстояние между разными мутациями.

Пересортировка генов. Вариантом рекомбинации является феномен, получивший название пересортировки генов. Она наблюдается при генетических взаимодействиях между вирусами, имеющими сегментированный геном. Образующиеся при этом гибридные формы вирусов называют реассортантами. Реассортанты вирусов гриппа получают при совместном культивировании вирусов с разными генами гемагглютинаина и нейраминидазы. В этом случае из общего потомства путем нейтрализации соответствующих антигенов можно выделить интересующие исследователя варианты.

Существуют определенные группировки (конstellации или созвездия) генов, которые в данной системе клеток более стойки и делают вирус более жизнеспособным.

Сходные процессы пересортировки генов имеют место у вирусов гриппа типов А, В и С и у других вирусов с фрагментарным геном – у буньявирусов, аренавирусов (однонитчатые РНК) и реовирусов (ротавирусов) (двунитчатая РНК). Однако эти процессы не столь интенсивны и доступны изучению, как у вирусов гриппа.

Перекрестная реактивация. Перекрестная реактивация, кросс-реактивация или реактивация при скрещивании, происходит в том случае, когда у одного из штаммов вируса часть генома повреждена, а другой геном интактен. При смешанной инфекции двумя такими вирусами возможна рекомбинация неповрежденных участков генома инактивированного вируса с геномом интактного вируса, и в результате этого процесса появляются штаммы вируса со свойствами обоих родителей. Описываемый феномен также обозначается как «спасение маркера», поскольку реактивируется (рекомбинирует) лишь часть генома инактивированного вируса, несущая какой-нибудь признак (маркер).

Гетерозиготность. При совместном культивировании двух штаммов вируса может происходить формирование вирионов, содержащих в своем со-

ставе два разных генома или по крайней мере один полный геном и часть второго генома. Это явление названо гетерозиготностью.

Комплементация. Комплементация (дополнение) является таким видом негенетического взаимодействия при смешанной инфекции двумя вирусами, которое стимулирует репродукцию обоих партнеров или одного из них, но не изменяет генотипы вирусов. Принцип комплементации заключается в том, что вирус снабжает партнера недостающими компонентами, обычно белками, структурными или неструктурными.

Комплементация может быть односторонней и двусторонней. Двусторонняя комплементация заключается в репродукции обоих партнеров, каждый из которых не способен к самостоятельной репродукции. При односторонней комплементации один из партнеров обеспечивает другого необходимыми для его репродукции продуктами. Вирус, стимулирующий репродукцию другого вируса, называется «вирус-помощник», а вирус, репродуцирующийся только в присутствии помощника, называется «вирус-сателлит».

Комплементация широко распространена среди вирусов и встречается как между родственными, так и неродственными вирусами. Феномен тесно связан с проблемой дефектности вирусов.

Поскольку в вирусной популяции помимо стандартных обычно присутствуют дефектные неинфекционные вирусные особи, в частности дефектные частицы, утратившие часть генетического материала, комплементация имеет место в инфекционном цикле многих вирусов и заключается в том, что члены популяции снабжают друг друга продуктами генов, которые дефектны у партнеров (негенетическая реактивация). Отличие комплементации от генетической рекомбинации заключается в отсутствии обмена генетическим материалом.

Комплементация встречается и у неродственных вирусов, принадлежащих к разным семействам. Одним из семейств, вирусы которого наиболее часто участвуют в комплементации, является семейство аденовирусов. В одних системах аденовирусы могут действовать как дефектные вирусы, в других – как помощники. Например, в культуре клеток почек макак резусов аденовирусы могут репродуцироваться только в присутствии SV40, который является в данном случае вирусом-помощником. В других системах сами аденовирусы действуют как вирусы-помощники, а вирусом-сателлитом является аденоассоциированный вирус, относящийся к семейству парвовирусов. Репродукция этого вируса полностью зависит от комплементирующего действия аденовирусов. Вирус гепатита В является помощником для дельта-агента, который покрывается его наружным белком – HBs-антигеном. Сочетание обоих вирусов обнаружено при наиболее тяжелых формах гепатита.

Возможна не только межцистронная, но и внутрицистронная комплементация в том случае, когда один ген кодирует несколько белков.

Фенотипическое смешивание. При совместном культивировании двух вирусов может наблюдаться феномен фенотипического смешивания, когда геном одного вируса бывает заключен в капсид, состоящий частично или полностью из белков другого вируса.

Фенотипическое смешивание наблюдается при смешанной инфекции многими вирусами, причем эти вирусы могут быть как близкими друг другу (например, вирусы гриппа А и В или разные серологические подтипы вируса гриппа А), так и весьма далекими (онковирусы и рабдовирусы).

4.6 Рестриктазы и физические карты вирусов

Подлинную революцию в физическом картировании геномов вирусов произвело применение рестриктаз и секвенирование вирусных геномов. Рестриктазы имеют исключительное значение в молекулярной генетике вообще и генетической инженерии в частности. Их открытие (1968—1970 гг.) впервые дало возможность специфически расщеплять ДНК на строго определенные фрагменты, доступные для препаративного выделения и анализа.

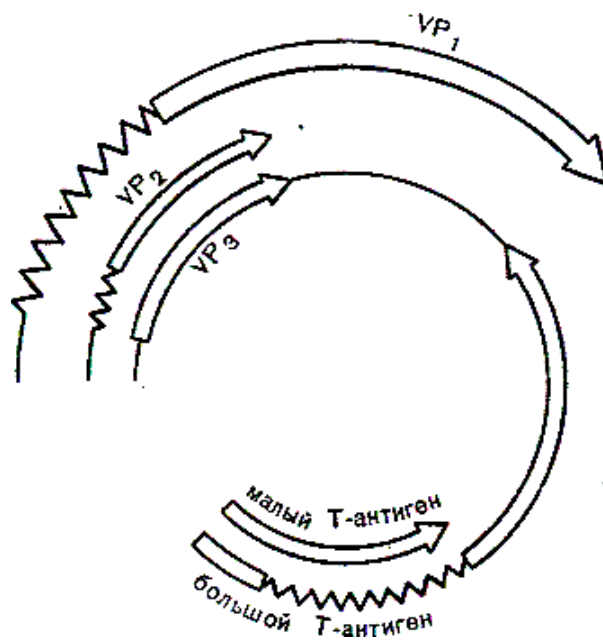
Рестриктазы или эндонуклеазы – это просто организованные белки, являющиеся ферментами, широко распространенными среди прокариотов и участвующими в генетических процессах. В отличие от экзонуклеаз, отщепляющих концевые нуклеотиды или свободные остатки фосфорной кислоты, эндонуклеазы расщепляют молекулу ДНК изнутри, обычно – в местах, где преобладают пиримидиновые основания. Рестриктазы характеризуются высоковыраженной специфичностью, распознавая строго определенные последовательности нуклеотидов в двунитчатой ДНК.

Число новых рестриктаз стремительно нарастает и со временем, по видимому, будут обнаружены рестриктазы, узнающие любую последовательность нуклеотидов.

Использование разных рестриктаз позволяет получать фрагменты разной величины, которые затем разделяются и анализируются путем электрофореза в агарозных или полиакриламидных гелях. Сочетание рестрикционного анализа с другими методами позволяет составить физические карты геномов вирусов. Физические карты вирусных геномов обозначают взаимное расположение генов, их границы, локализацию начала репликации, промоторов, лидеров, экзонов и интронов, сигнальных последовательностей и других генетических элементов.

Физическая карта генома SV40 приведена на рисунке 19. Границы генов, кодирующих синтез ранних и поздних белков, и направление транскрипции самих генов показаны стрелками. Из этой схемы видно, что генетический код для синтеза белков этого вируса записан не на одной, а на обеих нитях ДНК и что транскрипция разных генов идет в разных направлениях.

В настоящее время полностью расшифрованы нуклеотидные последовательности отдельных генов и целых геномов методом секвенирования (от англ. *sequence* – последовательность). Если речь идет о РНК-содержащих вирусах, то предварительным условием для дальнейшего их анализа является переписка РНК на ДНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы), после чего генетический материал может быть подвергнут рестрикционному анализу.



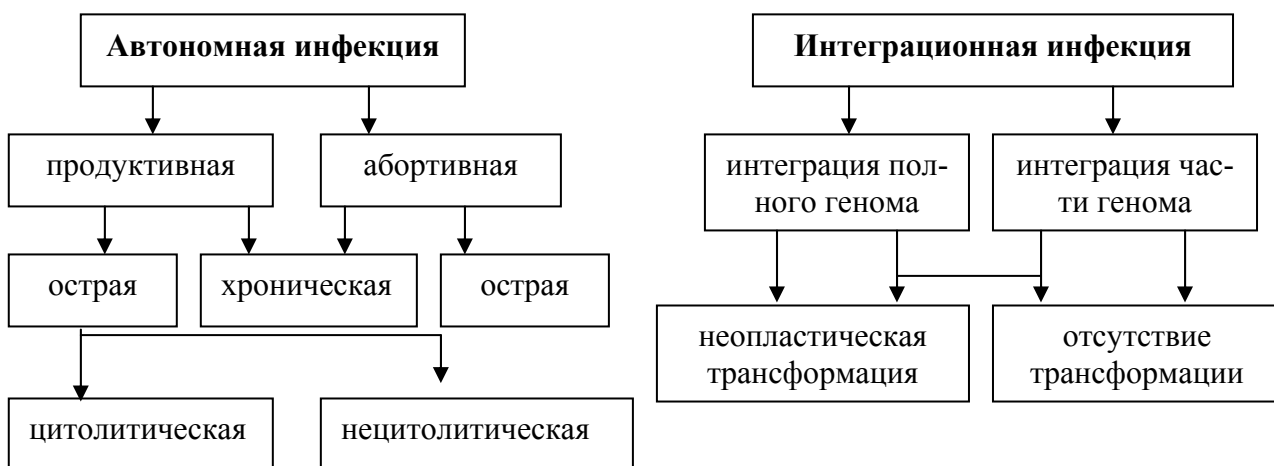
Стрелки указывают направление синтеза и размеры соответствующих генов; зигзагообразные участки – интроны, VP – вирусный белок.

Рисунок 19 – Структура генома SV40

5 Патогенез вирусных инфекций

Под инфекцией понимают комплекс процессов, происходящих при взаимодействии инфекционного агента с организмом хозяина. Однако в связи с тем, что вирусы являются внутриклеточными паразитами, а точнее, генетическими паразитами, в основе их взаимодействия с организмом всегда лежит инфекционный процесс на уровне клетки, который реализуется путем взаимодействия вирусного и клеточного геномов. Поэтому возможно классифицировать инфекции как на клеточном уровне, так и на уровне организма.

Уровень клетки



Уровень организма

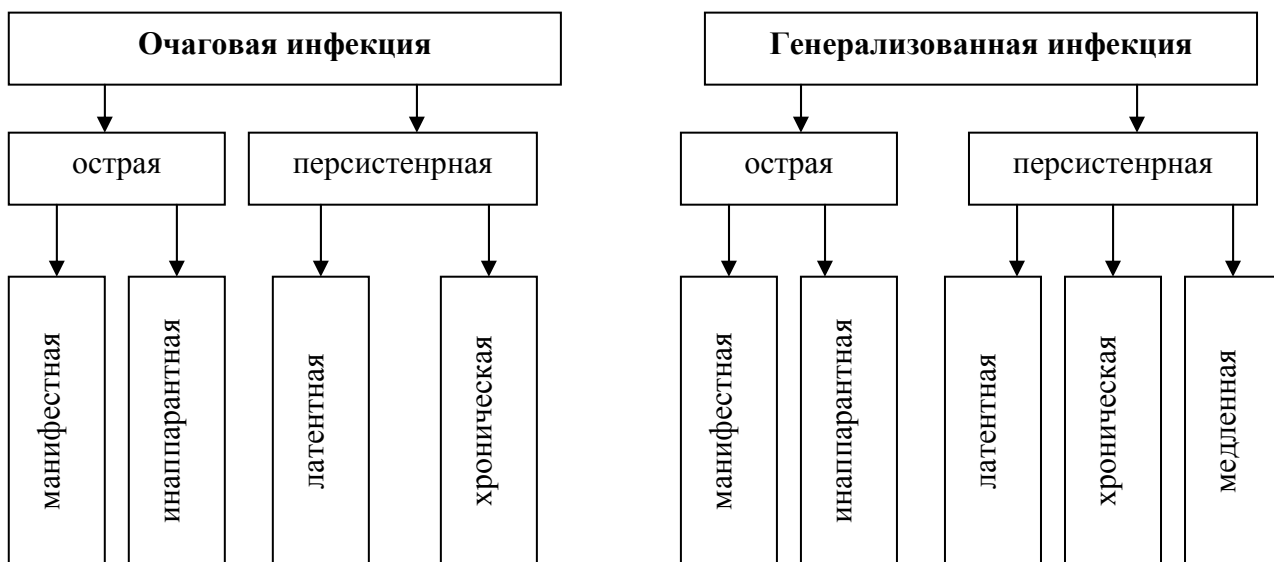


Рисунок 20 – Схема Классификация вирусных инфекций

5.1 Классификация вирусных инфекций на клеточном уровне

Автономные и интеграционные инфекции. Если вирусный геном реплицируется независимо от клеточного генома, такая инфекция называется автономной. Понятие автономии относительно, оно ограничивается лишь от-

сутствием физической связи между вирусным и клеточным геномами, хотя взаимодействие их постоянно происходит в течение инфекции. Автономная форма вирусной инфекции характерна для большинства вирусов животных.

Если вирусный геном включается в состав клеточного генома, или, как принято называть этот процесс, интегрируется с клеточным геномом и реплицируется вместе с ним, такая инфекция называется интеграционной. Интеграционная инфекция возникает в результате физического объединения генома вируса и клетки. При этой форме инфекции вирусный геном реплицируется и функционирует как составная часть клеточного генома. Интегрироваться могут как полный геном, так и часть генома. При гепатите В возможна интеграция полного генома, при аденовирусных и герпесвирусных инфекциях обычно интегрируется часть генома, при инфекции онковирусами может интегрироваться как полный геном, так и часть его. Вирусные последовательности в составе клеточного генома называются провирусом, или провирусной ДНК.

При интеграционных инфекциях нет ни сборки вирусной частицы, ни выхода вируса из клетки. Клетка может сохранить нормальные функции и при ее делении вирусные последовательности могут переходить в геном дочерних клеток. Такая ситуация наблюдается в случае инфекции, вызванной онкогенными вирусами. Интеграция может привести к неопластической трансформации клетки. Трансформированная клетка приобретает способность к неограниченному делению в результате нарушения регуляторных механизмов, контролирующих деление. Интеграционный тип инфекции возможен для нескольких семейств ДНК-содержащих вирусов: аденовирусов, паповавирусов, вирусов герпеса, а также для вируса гепатита В и обязателен для одного семейства РНК-содержащих вирусов – ретровирусов. В соответствии с данными В. М. Жданова, интеграционная форма инфекции может возникнуть при заражении и другими РНК-содержащими вирусами, такими, как вирус клещевого энцефалита (семейство тогавирусов), вирусы кори и SV5 (семейство парамиксовирусов) и др. Обязательным условием в этом случае является присутствие в клетках фермента – обратной транскриптазы, необходимого для процесса интеграции. Возникающая интеграционная инфекция может явиться причиной ряда хронических и аутоиммунных заболеваний.

Механизм интеграции вирусного генома с клеточным геномом. Из многих моделей, объясняющих процесс интеграции, наиболее признанной является модель Кемпбелла. В соответствии с этой моделью для интеграции с клеточным геномом необходима кольцевая форма двунитчатой вирусной ДНК. Эта молекула ДНК прикрепляется к клеточной ДНК, в месте прикрепления обе молекулы разрезаются и образовавшиеся концы сшиваются таким образом, что вирусная ДНК становится частью клеточного генома. Существенную роль в интеграции играют длинные концевые повторы двунитчатой ДНК, которые определяют специфичность интеграции в результате узнавания ими определенных участков клеточного генома. ДНК паповавирусов яв-

ляется циркулярной и двунитчатой и полностью отвечает требованиям модели Кемпбелла.

Продуктивная и abortивная инфекции. Инфекция может быть продуктивной и abortивной. Продуктивная инфекция завершается образованием инфекционного потомства. Abortивной называется инфекция, которая завершается образованием инфекционных вирусных частиц, или они образуются в гораздо меньшем количестве, чем при продуктивной инфекции. Abortивная инфекция может возникнуть при следующих трех обстоятельствах: 1) заражение чувствительных клеток дефектным вирусом; 2) заражение чувствительных клеток в неразрешающих условиях; 3) заражение нечувствительных клеток стандартным вирусом.

Заражение чувствительных клеток дефектным вирусом. Дефектным называется такой вирус, который не способен проявить все генетические функции, необходимые для образования инфекционного потомства.

Существуют дефектные вирусы и дефектные вирусные частицы. Дефектными называются такие вирусы, которые репродуцируются лишь в присутствии вируса-помощника, например аденоассоциированный вирус (семейство парвовирусов), дающий потомство только в присутствии аденовируса-помощника. Дефектные вирусные частицы накапливаются в популяции многих вирусов, особенно при пассировании их с высокой множественностью инфекции. Дефектные частицы интерферируют при репродукции вируса с инфекционными вирусными частицами и потому называются дефектными интерферирующими частицами (ДИ-частицами). Этот тип вирусных частиц наиболее хорошо изучен на модели вирусов везикулярного стоматита и гриппа. Получение дефектных частиц вируса гриппа при заражении куриных эмбрионов с высокой множественностью инфекции получило название феномена фон Магнуса по имени исследователя, впервые его описавшего. Дефектные вирусные частицы вызывают abortивную инфекцию в связи с тем, что они лишены части генетического материала. Например, дефектные частицы вируса гриппа содержат неполные последовательности Р-генов, кодирующих три высокомолекулярных вирусных белка.

Заражение чувствительных клеток в неразрешающих условиях. Abortивная инфекция может возникать при изменении условий, в которых происходит инфекционный процесс. Эти условия возникают в организме и могут моделироваться в эксперименте; в организме – повышение температуры, изменение рН в очаге воспаления и концентрации ионов, наличие антиметаболитов, ингибиторов и т.д.; в эксперименте – изменение температуры инкубации, состава питательной среды, внесение антиметаболитов и ингибиторов и т.д. В результате клетка либо погибнет без продукции инфекционного вируса, либо инфекция прерывается на определенном этапе. При устранении неразрешающих условий abortивная инфекция превращается в продуктивную. Смена abortивной инфекции на продуктивную может осуществиться и с помощью вируса-помощника.

Заражение нечувствительных клеток стандартным вирусом приводит к наиболее распространенной форме abortивной инфекции.

Непермиссивность клетки к определенному вирусному агенту может проявиться на любом этапе инфекции. Чувствительность клетки к ряду вирусов определяется наличием на клеточной поверхности специфических рецепторов, обуславливающих адсорбцию и проникновение вируса в клетку. Такой генетически обусловленный механизм клеточной резистентности наиболее четко установлен для пикорнавирусов, а также онковирусов птиц. Для большинства вирусов можно подобрать две клеточные системы, в одной из которых будет развиваться продуктивная, а в другой – abortивная инфекция. Механизм генетически обусловленной резистентности клеток к вирусам широко варьирует, но в основе его лежит либо отсутствие клеточных факторов, необходимых для репродукции вируса, либо наличие факторов, нарушающих процесс репродукции.

У сложно устроенных вирусов клеточная непермиссивность часто проявляется на стадии сборки вирусных частиц; нарушение сборки в некоторых непермиссивных системах для вирусов гриппа и парамиксовирусов обусловлено уменьшением количества молекул матриксного белка вируса.

Острая и хроническая инфекция. Как продуктивная, так и abortивная инфекция может протекать в виде острой или хронической инфекции.

Острой называется такая форма инфекции, при которой после образования вирусного потомства клетка либо погибает, либо выздоравливает и не содержит вирусных компонентов.

Хроническая инфекция – это такая форма инфекции, при которой клетка продолжает продуцировать вирусные частицы или вирусные компоненты в течение длительного времени и передает эту способность дочерним клеткам.

Чаще хроническую форму приобретает abortивная инфекция, так как вирусный генетический материал обычно не входит в состав вирусного потомства, а накапливается в клетках и передается в дочерние клетки. Одним из факторов, вызывающих хроническую инфекцию, являются ДИ-частицы. Такие частицы, попадая в клетки вместе с инфекционными вирусными частицами, конкурируют с ними за факторы репродукции и препятствуют образованию инфекционного потомства. В результате гибель клеток предотвращается. При появлении в системе новых чувствительных клеток в них вновь возникает продуктивная инфекция с образованием ДИ-частиц, и такой цикл инфекции возобновляется снова и снова.

Цитолитическая и нецитолитическая инфекции. Острая инфекция на клеточном уровне может быть цитолитической и нецитолитической в зависимости от судьбы зараженной клетки. Инфекция, завершающаяся гибелью (лизисом) клетки называется цитолитической. Инфекция, которая непосредственно не приводит к лизису клетки, и клетка еще может функционировать в течение некоторого периода времени, продуцируя вирусные частицы, называется нецитолитической.

Смешанная инфекция. В естественных условиях распространен феномен смешанной инфекции, при котором клетка заражается двумя или несколькими разными вирусами. Два и больше инфекционных процесса, про-

исходящих одновременно в одной клетке, могут оказывать различное влияние друг на друга. Возможны несколько вариантов взаимодействия вирусов в процессе смешанной инфекции.

1 Один из вирусов подавляет репродукцию второго вируса, или подавляется репродукция обоих вирусов. Этот феномен называется интерференцией вирусов.

2 Вирус усиливает репродукцию второго вируса в результате комплементации или экзальтации. Комплементация может происходить между двумя родственными или неродственными вирусами, например, между аденовирусом и аденоассоциированным вирусом человека или SV40, при этом вирус-помощник предоставляет другому вирусу неструктурный белок. Экзальтация может быть связана с подавлением процесса образования интерферона первым вирусом.

3 Оба вируса не оказывают существенного влияния на процесс репродукции каждого из них, однако может происходить нарушение морфогенеза обоих вирусов.

Смешанная инфекция широко используется вирусологами для изучения генетических функций вирусов и дефектности геномов.

5.2 Цитопатология зараженной вирусом клетки

Патологические изменения зараженных вирусами клеток обусловлены специфическими и неспецифическими процессами. К неспецифическим процессам относятся процессы, обусловленные изменением проницаемости плазматической мембраны, маргинация хроматина, хромосомные аберрации, пикноз ядер, вакуолизация цитоплазмы. Последнее свойство может приобретать настолько своеобразный и выраженный характер, что превращается в специфический признак некоторых вирусных инфекций. Так, один из вирусов, вызывающий такой процесс, SV40 – получил название «вакуолизирующий вирус». Специфическими изменениями являются, например, вирусные включения, образование симпластов. Специфические и неспецифические процессы могут привести к деструкции клетки.

Цитопатический эффект и его причины. Деструкцию клетки, возникающую при цитолитической инфекции, называют цитопатическим эффектом, а вирус, вызывающий этот эффект, называют цитопатогенным. Большинство вирусов животных являются цитопатогенными, и это свойство лежит в основе патогенеза ряда вирусных инфекций. Цитопатический эффект широко используется в лабораторной диагностике вирусных инфекций для индикации вируса в культуре клеток и выявления антител в сыворотках переболевших.

Цитопатический эффект является следствием нескольких причин: 1) нарушение нормальной жизнедеятельности клетки в результате механического повреждающего действия вирусных компонентов на клеточные структуры; 2) повреждение лизосом, в результате чего освобождаются высокоактивные лизосомальные ферменты, вызывающие аутолиз клетки; 3) интенсив-

ное истощение белковых и энергетических ресурсов клетки за счет переключения клеточных ферментов и белок-синтезирующего аппарата на синтез вирусспецифических макромолекул; 4) специфическое повреждающее действие вирусов на клеточные молекулы. Эти причины повреждения клетки различным образом проявляются и сочетаются при разных вирусных инфекциях.

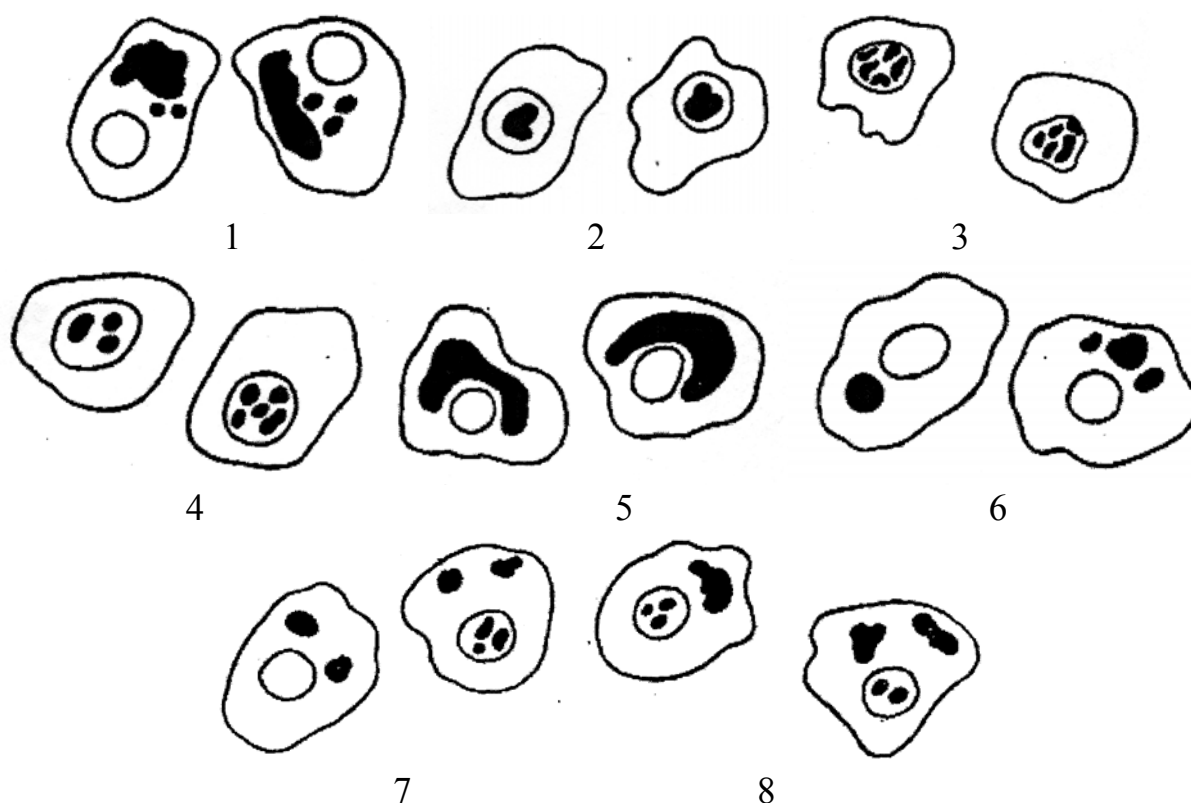
Среди РНК-содержащих цитопатогенных вирусов пикорнавирусы оказывают наиболее быстрое и глубокое действие на синтез клеточных белков. Причиной выключения белкового синтеза является блокирование узнавания рибосомой «шапочки» клеточных иРНК. Поскольку РНК вируса полиомиелита транслируется по механизму, независимому от «шапочки», происходит селективное подавление трансляции клеточных иРНК.

Вирусные включения. Вирусные включения, выявляющиеся при окрашивании зараженных клеток, являются специфическими морфологическими признаками вирусной инфекции, часто имеющими диагностическое значение. Внутриклеточные вирусные включения были обнаружены гистологами еще в прошлом столетии. Д.И. Ивановский обнаружил в клетках растения, зараженного вирусом табачной мозаики, кристаллоподобное включение, которое впоследствии получило название «кристаллы Ивановского». Позже было доказано, что «кристаллы Ивановского» представляют собой скопление вирусов табачной мозаики.

Вирусные включения выявляются в ядре или цитоплазме зараженной клетки. В зависимости от прокрашивания разными красителями включения бывают барофильными и ацидофильными (эозинофильными). Включения при разных вирусных инфекциях различаются по величине, форме, численности. Они могут быть одиночными и множественными, крупными и мелкими, округлыми или неправильной формы (рисунок 21). Характерные ядерные включения формируются в клетках, зараженных вирусами герпеса, полиомы, аденовирусами, флавивирусами, вирусом ящура. Характерные цитоплазматические включения формируются в клетках, зараженных вирусами оспы, гриппа, бешенства.

Природа включений разнообразна. Большинство включений представляют собой «вирусные фабрики», т.е. очаги, в которых идет транскрипция и репликация вирусных геномов и сборка вирусных частиц. В клетках, зараженных реовирусом, образуются причудливые серповидные околоядерные включения; при электронно-микроскопическом исследовании они оказались связанными с нитями митотического веретена, в ассоциации с которыми идет репродукция этого вируса. Включения могут представлять собой скопление вирусных частиц, как, например, внутриядерные включения в клетках, зараженных аденовирусами и вирусом полиомы, либо скопление молекул вирусных белков, например ядерные и цитоплазматические включения в клетках, зараженных вирусом гриппа, представляющие собой скопление молекул неструктурного вирусного белка. Некоторые включения содержат только клеточный материал, например, ядерные ацидофильные включения в клетках, зараженных вирусами герпеса на поздней стадии инфекции.

Симпласты. Некоторые вирусы вызывают характерный цитопатический эффект, проявляющийся в слиянии клеток и образовании многоядерных клеток, называемых симпластами или синтицием. Образование симпластов обусловлено действием на клеточные мембраны прилежащих друг к другу клеток вирусных белков слияния и определяется тем же механизмом, который обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембраны и проникновение вирусов в клетку. Слияние может происходить как за счет белков родительского вируса при заражении клеток большими концентрациями вируса (слияние снаружи), так и за счет внутриклеточного накопления вновь синтезированных вирусных белков слияния (слияние изнутри). Образование симпластов вызывают многие вирусы: парамиксовирусы, некоторые ретровирусы, вирусы герпеса. В определенных условиях (при низких значениях рН) слияние вызывают вирусы гриппа, буньявирусы и др.



1 — клетки, зараженные вирусом оспы; 2 — клетке, зараженные вирусом герпеса (тельца Каудри); 3 — клетки зараженные аденовирусом; 4 — клетки, зараженные паповавирусом SV40; 5 — клетки, зараженное реовирусом; 6 — клетки, зараженные вирусом бешенства (тельца Негри); 7 — клетки, зараженные вирусом гриппа; 8 — клетки, зараженные вирусом кори; цитоплазматические и внутриядерные включения обозначены черным цветом.

Рисунок 21 – Типы вирусных включений (схема)

Особенности вирусной инфекции в клеточной популяции. Основной особенностью вирусной инфекции в клеточной популяции является гетерогенность системы в связи с гетерогенностью вирусных частиц и клеток, входящих в состав популяции. В любом вирусном препарате наряду с инфекционными вирионами находятся ДИ-частицы. Клетки в каждой клеточной популяции широко варьируют по чувствительности к вирусу, и инфекция мо-

жет протекать не так, как на клеточном уровне. Например, при первом заражении вирусом, вызывающим в клетках продуктивную инфекцию, чувствительные клетки популяции могут погибнуть, и в популяции за счет некоторого количества нечувствительных клеток может установиться хроническая инфекция.

5.3 Классификация вирусных инфекций на уровне организма

В основу классификации положены четыре фактора: 1) генерализация вируса; 2) продолжительность инфекции; 3) проявление клинических симптомов; 4) выделение вируса в окружающую среду. Основанная на этих признаках классификация инфекций, как и любая другая, в известной мере условна, поскольку одна форма может перейти в другую, например, очаговая инфекция – в генерализованную, острая инфекция – в хроническую, латентная – в хроническую и т.д.

Очаговая и генерализованная инфекции. Вирусные инфекции можно разделить на две большие группы: 1) очаговые, когда действие вируса проявляется у входных ворот инфекции в связи с его локальной репродукцией, и 2) генерализованные, при которых после ограниченного периода репродукции вируса в первичных очагах происходит генерализация инфекции, и вирус достигает чувствительных тканей, формируя вторичные очаги инфекции. Очаговые инфекции имеют более короткий инкубационный период, чем генерализованные, защитными факторами организма при этих инфекциях являются скорее секреторные антитела класса IgA, чем антитела гуморальные, а эффективными вакцинами – те, которые стимулируют образование секреторных антител. При генерализованных инфекциях большее значение в защите организма имеют гуморальные антитела. Примером очаговых инфекций являются респираторные и кишечные вирусные инфекции, примером генерализованных – оспа, корь, полиомиелит. Сравнительная характеристика очаговых и генерализованных инфекций представлена в таблице 3. Примером генерализованной инфекции является корь, а очаговой – заболевания, вызываемые респираторно-синцитиальным вирусом, и другие острые респираторные вирусные инфекции.

Острая и персистентная инфекции. Острая инфекция длится относительно непродолжительный период времени и протекает с выделением вирусов в окружающую среду. Окончание инфекции сопровождается элиминацией вирусов благодаря иммунным механизмам. Инфекция может протекать как в клинической, так и в инapparантной форме. Острая инфекция может завершиться выздоровлением или гибелью организма. Она соответствует продуктивной инфекции на уровне клетки. При продолжительном взаимодействии вируса с организмом возникает персистентная форма инфекции (от лат. *persistentia* – упорство, постоянство).

Один и тот же вирус может вызвать как острую, так и персистентную инфекцию в зависимости от состояния организма и в первую очередь его иммунной системы. Например, вирус кори может вызвать как острую инфек-

цию, так и медленную (длительно текущую) – подострый склерозирующий панэнцефалит. Вирусы герпеса, гепатита В и аденовирусы могут вызвать острую и персистентную инфекции и т.д.

Персистентные инфекции могут быть латентными, хроническими или медленными в зависимости от выделения вируса в среду и проявления симптомов заболевания.

Таблица 3 – Сравнительная характеристика очаговых и генерализованных вирусных инфекций

Свойства инфекции	Очаговые инфекции	Генерализованные инфекции
Место патологического процесса	Входные ворота	Системы тканей и органов
Инкубационный период	Относительно короткий	Относительно длинный
Наличие вирусемии	Редко	Обычно
Продолжительность иммунитета	Кратковременный или неизученный	Обычно длительный
Иммунные механизмы	Секреторные антитела (IgA), локальный клеточный иммунитет	Гуморальные антитела (IgG, IgM), системный клеточный иммунитет

Латентная инфекция – это скрытая инфекция, не сопровождающаяся выделением вирусов в окружающую среду. При латентных инфекциях вирус не всегда удается обнаружить либо в связи с его дефектным состоянием, либо в связи с персистенцией субвирусных компонентов, либо в связи с интеграцией клеточным геномом. При воздействии ряда активирующих инфекцию факторов может произойти активация вируса, и латентная инфекция может перейти в острую или хроническую. Латентные инфекции могут вызывать аденовирусы, вирусы герпеса, онкогенные вирусы, вирус СПИД и др.

Хронической инфекцией называется длительно текущий патологический процесс, характеризующийся периодами ремиссий, перемежающимися с периодами обострения, когда вирус выделяется в окружающую среду. Примерами хронической инфекции являются герпетическая, аденовирусная инфекции, хроническая форма вирусных гепатитов и т. д.

Медленные инфекции – это своеобразное взаимодействие определенных вирусов с организмом, характеризующееся длительным инкубационным периодом, тянущимся многие месяцы и даже годы, и последующим медленным, но неуклонным развитием симптомов заболевания, ведущим к тяжелому нарушению функций органов и летальному исходу.

К медленным инфекциям относятся медленно прогрессирующие заболевания, в частности, заболевания ЦНС со спонгиозными энцефалопатиями у человека – куру, болезнь Крейтцфельдта – Якоба (пресенильная деменция), а у животных – трансмиссивная энцефалопатия норки и скрепи у овец. К медленным инфекциям относят также подострый склерозирующий панэнцефалит, который вызывается вирусом кори, рассеянный склероз,

амиотрофический боковой склероз и некоторые другие заболевания человека и животных.

При некоторых медленных инфекциях существенную роль играют генетические механизмы (скрепи, куру, амиотрофический боковой склероз), при других – иммунопатологические механизмы (подострый склерозирующий панэнцефалит, алеутская болезнь норок, лимфоцитарный хориоменингит).

Персистентные инфекции являются серьезной проблемой современной вирусологии и медицины. Большинство вирусов человека и животных способны персистировать в организме и вызывать латентные и хронические инфекции, и удельный вес персистентных инфекций намного превышает таковой острых инфекций. При персистентных инфекциях постоянно или периодически происходит выделение вирусов в окружающую среду, и персистентные инфекции являются основным фактором «проэпидемичивания» населения. Персистенция вирусов обуславливает их сохранение как биологического вида является причиной изменчивости свойств вирусов и их эволюции.

Большую роль персистенция вирусов играет в перинатальной патологии. Вертикальная передача персистирующего вируса от инфицированной матери плоду и активная репродукция вируса в его тканях особенно опасны в первые месяцы беременности, так как приводят к аномалиям развития плода или его гибели. К числу таких вирусов относятся вирусы краснухи, простого герпеса, ветряной оспы, цитомегалии, Коксаки В и ряд других.

Борьба с персистентными инфекциями затруднена из-за отсутствия адекватных подходов к их лечению и профилактике.

5.4 Патогенез вирусных инфекций

Под патогенезом следует понимать совокупность процессов, вызывающих заболевание и определяющих его развитие и исход. Патогенез вирусного заболевания определяется следующими факторами: 1) тропизмом вируса; 2) скоростью репродукции вируса и количеством инфекционных частиц в потомстве; 3) реакцией клетки на инфекцию; 4) реакцией организма на вызванные инфекцией изменения клеток и тканей.

Тропизм вируса к определенным клеткам и органам характерен для большинства вирусных инфекций. В зависимости от поражения тех или иных органов и тканей различают нейроинфекции, инфекции дыхательных путей, кишечные и др.

В основе тропизма вирусов лежит чувствительность к вирусу определенных клеток, а, следовательно, тканей и органов. Это свойство вирусов заражать лишь определенные клетки называется зависимым от хозяина ограничением. Патогенность вируса является генетическим признаком, обусловленным соотношением (конstellацией) вирусных генов. Фенотипическим проявлением патогенности является вирулентность. Этот признак значительно варьирует в разных системах. Вирулентность не идентична зависимому от хозяина ограничению, однако при некоторых инфекциях причины, обуслов-

ливающие вирулентность вируса, могут определить и возникновение инфекции. Например, вирулентность вируса гриппа в разных клеточных системах обусловлена степенью нарезания гемагглютинина-предшественника на две субъединицы – большую и малую, которое осуществляют клеточные протеазы. Нарезание зависит как от величины, структуры и конформации участка белка, так и от наличия и концентрации специфических клеточных протеаз. При отсутствии нарезания инфекция не возникает, а разная степень его определит вирулентность вируса в данной клеточной системе.

Вирулентность вируса определяется многими факторами организма: конституция, возраст, питание, наличие стресса, естественный и приобретенный иммунитет, интерферон могут определить течение инфекции и ее исход.

Понятие «токсичность» при вирусных инфекциях лишено смысла, так как ни эндотоксинов, ни экзотоксинов применительно к вирусам не существует.

5.4.1 Пути проникновения вируса в организм

Вирус проникает в организм разными путями, которые определяются локализацией чувствительных клеток в организме и механизмом передачи вирусов от одного хозяина к другому.

Одни вирусы используют строго определенный путь проникновения в организм. Например, ортомиксовирусы, ряд парамиксовирусов, коронавирусов, аденовирусов, риновирусы способны репродуцироваться только в клетках слизистых оболочек дыхательных путей человека и животных, и, следовательно, единственным путем проникновения в организм является воздушно-капельный. Другие вирусы способны к репродукции в разных клеточных системах. Например, вирусы герпеса и оспы способны вызвать заболевание при внутри кожном, внутривенном, интраназальном, внутримозговом введении.

В естественных условиях возможны следующие пути проникновения вируса в организм.

Воздушно-капельный. Вирус проникает в дыхательные пути в составе капель, попавших в воздух из дыхательных путей больного. Чем меньше капли, тем легче и глубже они туда проникают. Вирусные частицы могут попадать также с частицами пыли. Крупные частицы пыли оседают на слизистой оболочке носа, а мелкие (не более 2 мкм) могут проникнуть глубоко в дыхательные пути и достичь альвеол.

Воздушно-капельным путем в организм попадают две группы вирусов: 1) респираторные вирусы, которые репродуцируются в эпителии слизистых оболочек дыхательных путей, вызывают местную (реже генерализованную) инфекцию и затем выводятся из организма; 2) вирусы, для которых дыхательные пути являются только входными воротами инфекции. Не вызывая местных поражений ткани, эти вирусы обуславливают генерализованную инфекцию, часто со вторичным поражением дыхательных путей. К таким вирусам относятся вирусы натуральной и ветряной оспы, кори, свинки.

Пищевой. Этим путем в пищеварительный тракт попадают энтеровирусы, реовирусы, многие альфа-вирусы, аденовирусы, некоторые парвовирусы и др.

Трансмиссивный. Вирус проникает в организм при укусе кровососущего насекомого (возбудители трансмиссивных инфекций – арбовирусы и некоторые вирусы семейства рабдовирусов).

Через кожу. Некоторые вирусы проникают в организм через поврежденную или даже неповрежденную кожу, например, вирусы бешенства (при укусе животных), коревой оспы, папилломы.

Половой. Таким путем в организм проникают вирусы герпеса, бородавок человека (семейство паповавирусов).

Парентеральный. Этим путем в организм попадает вирус гепатита В. Заражение вирусом может произойти при всякого рода парентеральных манипуляциях – хирургических вмешательствах, переливании крови, стоматологических операциях, при маникюре и педикюре и т.д.

Вертикальный. Этот путь передачи встречается, в частности, при интеграционных инфекциях, когда в дочерние клетки попадает клеточный геном с интегрированными последовательностями вирусного генома, и при инфекциях с внутриутробным заражением плода, что характерно для вируса краснухи при заболевании женщин, особенно в первые 3 мес. беременности. Поражения плода могут вызывать вирусы цитомегалии, простого герпеса, Коксаки и др.

5.4.2 Распространение вирусов в организме

Лимфатическая система. Лимфатические сосуды являются одним из основных путей, по которым вирус распространяется от места первоначальной локализации (кожа, слизистая оболочка дыхательных путей и пищеварительный аппарат). Примером распространения вирусов по лимфатической системе является поражение лимфатических узлов после подкожной противооспенной вакцинации. Инфицированные лимфатические узлы могут быть вторичным очагом инфекции.

Кровеносная система. Гематогенный путь является основным путем распространения вируса в организме, и вирусемия является обычным симптомом при большинстве вирусных инфекций. В кровь вирусы могут поступать из лимфатической системы, переноситься с помощью лейкоцитов, проникать в кровеносные капилляры из первично инфицированных тканей. Вирусемия поддерживается путем постоянного поступления вирусов в кровь или же при нарушении механизмов элиминации вирусов из крови. Длительность нахождения вируса в токе крови может определяться размером вирусной частицы: более крупные вирусные частицы быстрее устраняются из тока крови, чем мелкие, поэтому вирусемия обычно имеет место при энтеровирусных инфекциях. Однако даже такие относительно мелкие вирусы, как тогавирусы менее чем за один час на 90 % выводятся из крови. Поэтому ряд вирусов использует специальные механизмы для длительной вирусемии. Не-

которые вирусы (например, вирусы оспы) обладают способностью репродуцироваться в клетках сосудистого эндотелия, откуда непосредственно попадают в кровь; многие вирусы фагоцитируются макрофагами, которые разносят их по организму и защищают от иммунных факторов. Доставка вируса макрофагами в лимфоузлы может лишь благоприятствовать инфекции, если вирус размножается в клетках лимфоцитов, поступая оттуда в кровь. Помимо макрофагов, вирус может связываться с другими клетками крови. Так, вирусы гриппа адсорбируются на эритроцитах, вирусы кори, паротита, герпеса, полиомиелита, клещевого энцефалита и др. адсорбируются на лейкоцитах, а некоторые вирусы способны репродуцироваться в лейкоцитах.

Нервные стволы. Нейрогенный путь распространения вирусов вдоль периферических нервов присущ вирусам бешенства, простого герпеса, полиомиелита. Вирус бешенства распространяется от входных ворот инфекции – места укуса – по нервам центростремительно к ЦНС, а оттуда – в слюнные железы, из которых вирус выделяется в слюну. Распространение вирусов герпеса в организме при опоясывающем герпесе происходит не только гематогенным, но и нейрогенным путем, при этом вирус может персистировать в дорсальных ганглиях и при определенных условиях может активироваться и распространяться по чувствительному нерву в обратном направлении. Рецепторы для вирусов герпеса обнаружены в синапсах нервных клеток. Вирус может распространяться по аксонам центростремительно и центростремительно со скоростью 200-400 мм в сутки.

Скорость распространения вирусов в организме и достижения чувствительных тканей определяет длительность инкубационного периода. Короткий инкубационный период имеют очаговые инфекции (грипп и другие респираторные инфекции, вирусные гастроэнтериты и др.), длительный – инфекции, возбудители которых попадают в чувствительные ткани после генерализации процесса (вирусные гепатиты).

5.5 Группы вирусов, вызывающих массовые инфекции

Вирусы, вызывающие респираторные инфекции. Виновниками острых респираторных заболеваний, помимо вирусов гриппа типов А, В и С, являются более 200 вирусов (включая их разные серотипы) и более 50 различных микроорганизмов – стафилококки, стрептококки, микоплазмы, хламидии и др. Заболевания дыхательных путей, так называемые острые респираторные заболевания (ОРЗ), вызывают парагриппозные, респираторно-синцициальные вирусы (семейство парамиксовирусов), риновирусы, вирусы Коксаки и ЕСНО (семейство пикорнавирусов), коронавирусы, аденовирусы. Наибольший удельный вес среди этих вирусов занимают риновирусы, которые не вызывают никаких других заболеваний, и коронавирусы; наиболее тяжелые заболевания с вовлечением нижних дыхательных путей вызывают респираторно-синцициальный вирус и вирус парагриппа типа 3.

Вирусы, вызывающие гастроэнтериты. Большинство вирусов не вызывают первичной инфекции желудочно-кишечного тракта, поскольку они

гибнут при контакте с кислой средой желудка и желчью двенадцатиперстной кишки. Однако есть вирусы, которые не разрушаются при этих условиях и вызывают первичные поражения слизистой оболочки пищеварительного тракта.

К вирусам, вызывающим гастроэнтериты у человека, относятся ротавирусы (семейство реовирусов), вирус Норфолка, кишечные аденовирусы, калицивирусы, астровирусы, коронавирусы и неидентифицированные мелкие сферические вирусные частицы.

Энтеровирусы, включая вирусы полиомиелита, Коксаки и ЕСНО, обычно не являются возбудителями гастроэнтеритов. После первоначальной репродукции в пищеварительном тракте они вызывают генерализованную инфекцию с поражением ЦНС.

Острые вирусные гастроэнтериты являются широко распространенной инфекцией, которая встречается как в эпидемической, так и эндемической форме. Эти инфекции поражают разные возрастные группы и занимают второе место по частоте заболеваемости после респираторных вирусных инфекций. Болезнь имеет острое начало и сопровождается поносом, тошнотой, рвотой, падением температуры, болями в желудке, головной болью, недомоганием, мигренью.

Основной трудностью в изучении этих вирусов является отсутствие адекватных методов их накопления и пассирования в лабораторных условиях. Для культивирования ротавируса человека требуются специальные условия, хотя ротавирусы животных сравнительно легко культивируются в культурах клеток. Вирус Норфолка, калицивирусы, астровирусы, коронавирусы, серотипы 40 и 41 аденовирусов не культивируются в обычных условиях. Даже кишечные аденовирусы отличаются отсутствием способности репродуцироваться в обычных культурах клеток.

Вирусы, вызывающие гепатиты. Первичное поражение печени вызывают следующие вирусы: вирус гепатита А, относящийся к семейству пикорнавирусов (энтеровирус типа 72), вирус гепатита В, относящийся к семейству гепаднавирусов, и сборная группа неклассифицированных вирусов, вызывающих гепатиты ни А ни В. По клиническому течению заболевания, вызванные разными вирусами, не всегда легко отличить друг от друга. Из числа больных гепатитами в нашей стране около 30 % приходится на долю больных гепатитом В, около 70 % - гепатитом А и около 10 % - гепатитом ни А ни В. Наиболее тяжелые формы гепатита, сопровождающиеся высокой летальностью, переходом в хроническую форму, длительным носительством антигена, первичным раком печени, вызывает вирус гепатита В.

6 Противовирусный иммунитет

Иммунная система представляет совокупность лимфоидных органов и тканей, основной функцией которой является распознавание и элиминация чужеродных веществ, Преимущественно белковой природы (т.е. веществ, синтез которых не кодирует ДНК хозяина), и обеспечение гомеостаза организма.

Антигены. Основной мишенью действия иммунной системы являются антигены, подавляющее большинство которых имеет белковую природу.

Определенная конфигурация аминокислот на поверхности антигена, обладающая иммуногенными свойствами, называется эпитоп, а участки перекрывающихся эпитопов образуют антигенные детерминанты. Антигенные детерминанты располагаются в области молекулы с доступной для антител поверхностью. Антигенные детерминанты могут быть и скрытыми, выходя на поверхность при изменении конформации или частичном расщеплении макромолекулы.

Антитела. Ответной реакцией иммунной системы на введение антигенов является появление антител – специфических иммуноглобулинов (Ig). Существует пять классов иммуноглобулинов, которые обозначаются символами IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Особое внимание привлечено к иммуноглобулину IgG, так как его молекулы составляют большинство всех сывороточных иммуноглобулинов и в значительной степени определяют уровень гуморального иммунитета. Молекулы IgG имеют коэффициент седиментации 7S и построены из идентичных двух тяжелых (H, heavy) и идентичных двух легких (L, light) цепей, соединенных дисульфидными связями. У тяжелых и легких цепей имеются постоянная и переменная области. В переменной области имеются аминокислотные последовательности, способные к специфическому связыванию с разными антигенами. Постоянная область цепей имеет одни и те же аминокислотные последовательности во всех антителах данной подгруппы и в связывании с антигеном не участвует. Антигенсвязывающий центр находится во фрагменте Fab. На другом конце молекулы находится фрагмент Fc, который не связывает антиген, но в нем локализованы центры связывания комплемента, фиксации на клеточных мембранах и ряд других функций. В электронном микроскопе молекулы иммуноглобулинов выглядят в виде структуры V-образной формы, оба конца которой составлены из переменных участков пар тяжелых и легких цепей. Антитела являются двухвалентными, так как оба конца их могут взаимодействовать с двумя антигенными детерминантами. Антитела класса IgM имеют коэффициент седиментации 19 S и являются пентамерами, под влиянием восстанавливающих веществ диссоциируют на пять субъединиц, каждая из которых состоит из двух легких и двух тяжелых цепей с коэффициентом седиментации 7 S, связанных между собой дисульфидными связями. Молекула IgA является димером, состоящим из двух мономеров. Функцию связывания димеров осуществляет J-цепь. Иммуноглобулины IgD и IgE являются минорными сывороточными

компонентами, т.е. находятся в сыворотке в наименьших концентрациях. При соединении антигена с антителом происходит взаимодействие между поверхностью антигенной детерминанты и активным центром иммуноглобулина, находящимся в вариабельной его части, таким путем, что комплементарные друг другу поверхности соединяются физико-химическими связями.

При введении в организм человека или животных антигенов выработка антител развивается в определенном порядке. При первичном введении антигена вначале появляются антитела класса IgM (3-6-й день), затем класса IgG (5—14-й день) и, наконец, класса IgA (15—21-й день). При повторном введении антигена антитела IgM-класса образуются в малом количестве и быстро образуются антитела классов IgG и IgA. Иммуноглобулины класса IgM являются антителами первичного ответа, иммуноглобулины класса IgG – основные антитела со строго выраженной специфичностью, в то время как иммуноглобулины класса IgA играют роль в формировании местного иммунитета слизистых оболочек (секреторные иммуноглобулины). Иммуноглобулины класса IgE фиксируются на клетках и имеют большое значение в развитии аллергических реакций (гиперчувствительности). Иммуноглобулины IgD обуславливают развитие аутоиммунных процессов и, возможно, препятствуют возникновению толерантности.

Т- и В-лимфоциты. В иммунной системе существуют две независимые, но функционирующие совместно клеточные популяции: Т-лимфоциты (тимусзависимые) и В-лимфоциты (не зависящие от тимуса). В-лимфоциты обеспечивают выработку антител и ответственны, таким образом, за большинство явлений гуморального иммунитета. Клеточный иммунитет обеспечивают Т-лимфоциты, одновременно осуществляющие функцию регуляции как В-, так и Т-системы. Эта функция Т-лимфоцитов опосредуется существованием ряда морфологических и функциональных субпопуляций, основными из которых являются Т-помощники (хелперы), Т-супрессоры, Т-киллеры и Т-индукторы. Отдельную ветвь представляют макрофаги. Иммуногенез обеспечивают восемь типов клеток – четыре типа Т-лимфоцитов, три типа В-лимфоцитов и макрофаги. Среди лимфоцитов периферической крови человека 55-60 % составляют Т-лимфоциты и 25-30 % - В-лимфоциты; 10-20 % лимфоцитов (нулевые клетки), по-видимому, являются предшественниками Т- или В-лимфоцитов.

Антителогенез. Предшественники В-клеток в костном мозге превращаются в В-лимфоциты, которые поступают в периферические лимфоидные органы и являются предшественниками трех типов плазматических клеток, продуцирующих антитела классов IgM, IgG и IgA. Подача Т-лимфоцитом включающего сигнала контролируется генами иммунного ответа. Молекула антигена распознается также и Т-супрессорами, ограничивающими пролиферацию В-клеток на различных стадиях иммунного процесса. Т-супрессоры являются также клетками, обеспечивающими «запрет» на образование аутоантител к собственным антигенам организма, т.е. иммунологическую толерантность. Огромное разнообразие антител обеспечивается существованием в организме млекопитающих не менее 1 млн. лимфоидных клеток, способных

дать пролиферацию независимому иммунокомпетентному клону, и обусловлено комбинацией вариабельных фрагментов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Моноклональные антитела. Моноклональные антитела получают путем гибридизации лимфоцитов селезенки мышей, иммунизированных определенным антигеном, с клетками злокачественной опухоли иммунной системы мышей – миеломы. Этот метод, предложенный в 1975 г. Милстейном и соавт, основан на способности таких гибридных клеток (гибридомы) к быстрому размножению с образованием клона специфических антител. Гибридные клетки можно поддерживать в перевиваемой культуре, а клонируя отдельные гибридные клетки, можно получить клоны, продуцирующие большое количество идентичных антител к одной антигенной детерминанте. Размноженный в культуре клон вводят мышам интра-яеритонеально и затем пассируют развившиеся опухоли. Асцитическая жидкость таких опухолей содержит моноклональные антитела в высоких титрах. Моноклональные антитела позволяют изучать отдельные детерминанты, а применение нескольких клонов позволяет дать исчерпывающую характеристику изучаемой группе вирусов.

Иммуногенез Т-лимфоцитов. Исходным событием иммуногенеза Т-лимфоцитов также является взаимодействие антигена с макрофагом. Антиген взаимодействует со структурами главного антигена гисто совместимости (HLA) макрофага и в таком виде распознается Т-лимфоцитами; В-лимфоцит также распознает антиген и получает дополнительный сигнал включения от стимулированного Т- лимфоцита. Взаимная активация лимфоцитов происходит благодаря специфическим к неспецифическим гуморальным факторам – лимфокинам и интерлейкинам. В результате происходит пролиферация и дифференцировка Т-клеток с образованием клонов эффекторных Т-лимфоцитов, которые распознают измененную клетку и уничтожают ее. Таким образом, основой иммунного процесса служит кооперативное функционирование клеточной «троицы»: Т- и В-лимфоцитов и макрофага.

Иммунологическая память. Иммунологической памятью называют способность организма давать ускоренные иммунологические реакции на повторное введение антигена. Иммунологическая память в ряде случаев сохраняется многие годы и свойственна как гуморальному, так и клеточному иммунитету. Клетками памяти является часть дочерних В- и Т-лимфоцитов, стимулированных данным антигеном, однако более длительную иммунологическую память имеют Т-лимфоциты.

Факторы неспецифической резистентности. Помимо иммунной системы, в организме существуют факторы неспецифической резистентности. К ним относятся кожные и слизистые покровы, являющиеся механическим препятствием для проникновения возбудителей инфекционных болезней и антигенов; лизоцимы, выделяемые слизистыми оболочками и циркулирующие в крови; пропердиновая система; мукопротеины клеток слизистых оболочек. К факторам неспецифической резистентности относится также система комплемента, состоящая из 12 белков нормальной сыворотки, которая непосредственно взаимодействует с иммунной системой.

6.1 Вирусные антигены

Вирусные антигены могут быть вирионными (входящими в состав вирионов) и вирусиндуцированными (находящимися в зараженной клетке). Вирионными антигенами могут быть либо простые белки, состоящие из одной полипептидной цепи, либо надмолекулярные образования, состоящие из нескольких полипептидных белков.

Вирусные антигены находятся и на поверхности зараженных клеток. Эти антигены обусловлены, во-первых, вновь образованными вирусными частицами, еще сохранившими связь с клеточной поверхностью, и в первую очередь вирусными частицами, выходящими из клетки путем почкования; во-вторых, встроенными в плазматическую мембрану клеток вновь образованными вирусными гликопротеидами при репродукции оболочечных вирусов. В процессе репродукции вируса в клетке происходит синтез вирус специфических неструктурных белков, которые также обладают антигенными свойствами.

Антигенные детерминанты вирусных антигенов. Антитела, вырабатываемые в ходе вирусной инфекции или при введении вирусных антигенов, взаимодействуют не со всей молекулой антигена, а с ее антигенными детерминантами, которые могут иметь разную природу.

На примере гемагглютинаина вируса гриппа можно видеть четыре типа антигенных детерминант, которые встречаются у вирусных антигенов. Первые две детерминанты обусловлены первичной последовательностью аминокислотных остатков и конформацией вторичной структуры этого участка белка – петлей в случае детерминанты А и α -спиралью в случае детерминанты В. Третья детерминанта (С) образуется в результате взаимодействия сближающихся разных участков мономера гемагглютинаина. Наконец, четвертая детерминанта (D) возникает в результате образования тримера гемагглютинаина, определяющего его четвертичную структуру.

6.2 Гуморальный иммунитет

Нейтрализация инфекционной активности вируса антителами осуществляется двумя путями:

1) в результате необратимых конформационных изменений структуры белков вирусной частицы у сложно устроенных вирусов, в основном, структуры молекул гликопротеидов; такой механизм нейтрализации требует участия комплемента;

2) в результате пространственной блокады молекулами антител вирусных прикрепительных белков и предотвращения связывания вириона с клеточными рецепторами.

Поскольку на поверхности вирусной частицы прикрепительные белки представлены во множественных копиях, нейтрализация по этому типу требует связывания с вирусной частицей более одной молекулы антител. Свя-

занные с недостаточным числом молекул антител вирусы могут прикрепиться к клетке и вызвать инфекционный процесс.

Гуморальный иммунитет играет важную роль в противовирусном иммунитете, и уровень антител в крови обычно является надежным показателем резистентности к таким вирусным инфекциям, как корь, клещевой энцефалит, полиомиелит и др. Повышение титра антител в парных сыворотках, т.е. взятых в раннем периоде болезни и в период выздоровления, используется для серологической диагностики вирусного заболевания, а исследования парных сывороток, взятых в начале и конце эпидемии у здоровых людей, позволяют оценить частоту бессимптомных форм изучаемой вирусной инфекции.

Гуморальный иммунитет определяют по наличию в крови антител преимущественно класса IgG. Однако при многих инфекциях, в частности при гриппе, ОРЗ, полиомиелите, и других энтеровирусных, ротавирусных инфекциях, важное значение имеет создание местного иммунитета слизистых оболочек дыхательных путей и пищеварительного тракта, связанное с образованием и секрецией антител класса IgA. Содержание их, не всегда коррелирующее с содержанием антител класса IgG, более объективно характеризует степень иммунитета к изучаемой вирусной инфекции.

Поскольку антитела класса IgG появляются не ранее, чем через одну неделю после заболевания и длительно циркулируют в крови, они имеют ограниченное значение для диагностики и не свидетельствуют о свежеперенесенной инфекции. Основная роль антител класса IgG сводится к защите организма от повторного заражения. Для установления свежеперенесенной инфекции определяют антитела класса IgM, которые появляются раньше, чем IgG, и раньше исчезают.

6.3 Клеточный иммунитет

Основным механизмом противовирусного иммунитета являются иммунные клеточные реакции, осуществляемые Т-эффекторами, а основную роль в этих клеточных реакциях играют Т-киллеры, которые распознают зараженную клетку в организме и вызывают ее цитоллиз. В результате организм освобождается от клеток, продуцирующих инфекционное вирусное потомство.

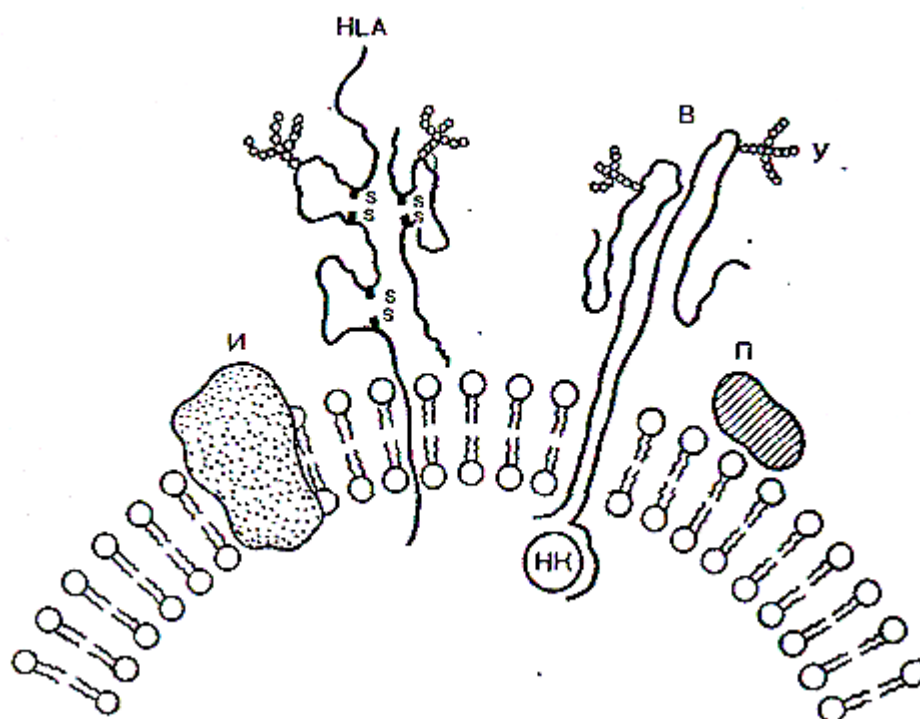
Индукцированные вирусным антигеном Т-лимфоциты приобретают свойства распознавать вирусный антиген, находящийся на поверхности зараженных клеток. Вирусные детерминанты, распознаваемые Т-лимфоцитами, сходны или идентичны детерминантам, выявляемым В-лимфоцитами на поверхности зараженных клеток. Однако в отличие от В-лимфоцитов, Т-лимфоциты распознают только те зараженные клетки, на поверхности которых вирусный антиген сцеплен с клеточными антигенами главного комплекса гистосовместимости – HLA у человека (рисунок 22).

Т-лимфоциты обладают высокой специфичностью и могут, например, различать клетки, которые заражены вирусами гриппа типа А или гриппа ти-

па В. Однако специфичность Т-лимфоцитов в отношении вирусов относительна и варьирует у разных таксономических групп.

Существенным фактором в противовирусном иммунитете являются макрофаги. Они принимают участие в иммунной стимуляции, распознавании антигена, регуляции пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Кроме того, они являются активными помощниками в разрушении и удалении из организма неродственных антигенов. Цитотоксическая активность макрофагов имеет неспецифический характер и проявляется на ранних стадиях инфекционного процесса.

В противовирусном иммунитете имеют значение и другие факторы клеточного иммунитета, такие как активность естественных киллеров и зависящая от антицитотоксичность, обусловленная неиммунными лимфоидными клетками.



В – вирусный гликопротеид, пронизывающий мембрану и контактирующий с вирусным нуклеокапсидом на цитоплазматической стороне мембраны; HLA – клеточный антиген гистосовместимости; П – периферический белок; И – интегральный белок плазматической мембраны; НК – вирусный нуклеокапсид.

Рисунок 22 – Строение плазматической мембраны зараженной вирусом клетки (схема)

Клеточный иммунитет, как указывалось, играет более важную роль при вирусных инфекциях, нежели гуморальный иммунитет. Лишь часть вирусов быстро разрушают пораженные ими клетки, большинство же вирусов не вызывают немедленной их гибели, а онкогенные вирусы, наоборот, вызывают пролиферацию пораженных клеток. Поэтому зараженные клетки становятся мишенью для цитолитического действия Т-эффекторов, естественных киллеров и макрофагов. Цитолитическое действие имеет место при всех вирусных

инфекциях и поэтому должно быть отнесено вместе с интерфероном к основным факторам, способствующим выздоровлению организма от вирусной инфекции.

Многие вирусы персистируют в организме, несмотря на наличие антител. Например, аденовирусы могут длительно персистировать в миндалинах, вирусы герпеса могут длительно и даже пожизненно сохраняться в нервных клетках чувствительного ганглия тройничного нерва или в дорзальных ганглиях. При ряде персистентных вирусных инфекций причиной персистенции является недоступность вируса для циркулирующих в крови антител. Некоторые вирусы способны распространяться из клетки в клетку без выхода во внеклеточное пространство. Например, вирусы герпеса могут проникать из одной клетки в другую по цитоплазматическим мостикам. Многие вирусы (вирусы парагриппа человека, кори, респираторно-синцитиальный и др.) вызывают слияние соседних клеток и распространяются путем формирования симпласта или синцития. Возможно проникновение вируса и субвирусных компонентов в дочерние клетки при клеточном делении. Существует несколько способов «ускользания» вирусов от иммунологического надзора:

- 1) подавление фагоцитоза;
- 2) угнетение Т- и В-системы;
- 3) особая локализация вируса в организме, защищающая его от действия иммуноцитов.

В результате создаются условия для распространения вируса в организме и его персистенции. Нарушение функции лимфоцитов имеется при большинстве вирусных инфекций. Вирусы гриппа, кори, полиомиелита, герпеса, ротавирусы и особенно вирус СПИД угнетают иммунные реакции Т-лимфоцитов, препятствуют их стимуляции. Вирус СПИД вызывает, деструкцию Т-хелперов. Вирусы герпеса – возбудители ветряной оспы и опоясывающего герпеса, цитомегалии, инфекционного мононуклеоза – приводят к увеличению абсолютного и относительного количества Т-супрессоров. Активацию супрессоров вызывает вирус клещевого энцефалита.

Таким образом, приобретенный иммунитет после перенесенной вирусной инфекции может быть разным: в одних случаях он защищает от повторных заболеваний на многие годы или на всю жизнь; в других случаях утрачивается через несколько лет и даже месяцев, в связи с чем возможны повторные заболевания; в третьих случаях иммунитет не предотвращает персистенцию вируса в организме и появление периодических рецидивов.

6.4 Экология вирусов

В экологии – науке о взаимоотношениях организмов друг с другом, включая популяции вирусов и другие таксономические группы, и с окружающей средой – существует понятие экологической ниши – места, занимаемого данной таксономической группой на земле. Экологическая ниша – широкое понятие, включающее в себя и ареал, и взаимоотношения изучаемой таксономической группы с другими группами организмов, и роль их в при-

родных биоценозах, и, наконец, место, занимаемое ими в биосфере. Вирусы, не будучи организмами, тем не менее, являются своеобразной формой жизни, которой присущи все основные ее проявления, вплоть до способности эволюционировать, приспособляться к меняющимся условиям среды. Лишенные собственных белоксинтезирующих систем, они являются автономными генетическими структурами, навсегда привязанными к внутренней среде организма – от простейшей прокариотической клетки до высшего многоклеточного организма. Эти организмы и являются экологической нишей вирусов.

Вирусы населяют одноклеточных прокариотов (бактерии) и эукариотов (грибы, простейшие), все виды растений и животных. Многие вирусы способны паразитировать в организме лишь одного вида. Такими являются некоторые фаги, вирусы растений, оспы животных, гепатитов человека. Другие вирусы поражают несколько близких видов животных. Такими являются многие бактериальные плазмиды, вирусы болезней картофеля и пасленов, вирус ящура, поражающий многие виды парнокопытных, вирусы гриппа человека и животных.

Существует большая группа вирусов, имеющих двухфазный тип распространения, при котором либо происходит последовательная смена хозяев, либо другой живой организм является механическим переносчиком. В ряде случаев организм насекомого является, наряду с организмом растения, местом размножения вируса. Это типичная двухфазная система, где вирус последовательно меняет двух хозяев, образующих прочный биоценоз, чем и обеспечивается сохранение и распространение данного вируса.

В частности, такие двухфазные системы чаще встречаются у вирусов, поражающих животных. В сущности, подавляющая масса вирусов, передающихся кровососущими членистоногими – клещами, комарами, москитами, мокрецами и т. п., последовательно сменяют двух хозяев, размножаясь обычно в организме каждого из них.

6.5 Эпидемиология вирусных инфекций

В эпидемиологии вирусных инфекций господствует антропоцентрический принцип, и эпидемиология вирусных инфекций или, по крайней мере, большинства из них, не имеет существенных отличий от эпидемиологии бактериальных или протозойных инфекций.

В соответствии с ее положениями, эпидемический (эпизоотический) процесс представляет непрерывную цепь заражений (инфекционных процессов), сопровождающихся выходом возбудителя во внешнюю среду, В этой цепи следует различать источники инфекции, факторы передачи и заражаемые восприимчивые организмы.

Источниками инфекции может быть человек или животное. Соответственно все болезни, вызываемые возбудителями, способными паразитировать только в организме человека, называются «антропонозы». Если же человек заражается от животного, такие болезни обозначают как «зоонозы». Примерами антропонозов среди вирусных инфекций являются грипп, корь, оспа,

герпес, полиомиелит. Примерами зоонозов являются клещевой энцефалит, лихорадка флеботомная (москитная лихорадка), лихорадка Ласса, лимфоцитарный хориоменингит, ящур.

К понятию источников инфекции примыкает, но не тождественно ему понятие резервуара инфекции, под которым подразумевают совокупность, видов, поддерживающих существование данного возбудителя. Для антропонозов резервуаром инфекции является человек, человеческое общество, иногда ограниченное определенным ареалом. Например, лихорадка денге распространена только в тропическом поясе. Для зоонозов под резервуаром инфекции понимают виды животных, среди которых циркулирует данный вирус, нередко включая кровососущих (клещей, насекомых), которые по отношению к человеку являются переносчиками.

Понятия «антропонозы» и «зоонозы» не всегда отражают действительные процессы в природе и обществе. Так, желтая лихорадка городская бесспорно является антропонозом, так как заболевание передается от человека к человеку через укусы комаров. Но первоисточником ее является желтая лихорадка лесная (лихорадка джунглей), природные очаги которой в Центральной Африке существуют независимо от людей и обеспечиваются циркуляцией вируса между обезьянами и комарами. Таким образом, это типичный зооноз. Вынос вируса желтой лихорадки лесной за пределы природных очагов и циркуляция его среди людей превращает болезнь в антропоноз.

Еще сложнее обстоит дело с гриппом. Эта глобальная инфекция является, бесспорно, антропонозом, так как человек заражается ею только от человека. Тем не менее, почти каждая крупная эпидемия гриппа сопровождается выбросом возбудителей в популяции домашних и диких животных (включая птиц), где эти вирусы могут сохраняться и циркулировать длительное время. Более того, имеются веские основания полагать, что в процессе пересортировки генов вирусов гриппа могут появляться штаммы, вызывающие эпидемии и пандемии, которые начинают циркуляцию среди людей по типу чистого антропоноза.

Источники инфекции (речь идет преимущественно об антропонозах) подразделяют на больных, носителей в стадии выздоровления (реконвалесценты) и здоровых носителей. Большинство вирусных инфекций в этом отношении почти не отличаются от бактериальных.

Факторы передачи вирусных заболеваний те же, что и при других инфекционных болезнях: воздух, вода, пища, почва, предметы обихода, а также членистоногие – преимущественно кровососущие. Соответственно различают воздушно-капельный механизм передачи, фекально-оральный, через поврежденные наружные покровы и посредством укуса кровососущих членистоногих (трансмиссивный путь передачи). При вирусных инфекциях существует еще один механизм передачи вирусов – вертикальный, который осуществляется двумя способами: внутриутробное заражение плода и генетическая передача. Внутриутробное заражение плода может наблюдаться при заражении беременной женщины вирусами краснухи, цитомегалии и др. Циркулируя в крови, эти вирусы проникают через плацентарные барьеры и по-

вреждают плод, вызывая развитие уродств. Генетическая передача характерна для онкогенных вирусов и обусловлена интеграцией их генома с геномом половых клеток.

Восприимчивые индивидуумы являются той почвой, на которой развивается эпидемический процесс. При инфекциях, передающихся воздушно-капельным путем, заболеваемость регулируется уровнем коллективного иммунитета, который формируется после очередной эпидемии. Примером является возникновение эпидемии кори в изолированных коллективах, все члены которого заболевают, за исключением лиц, перенесших корь при предыдущем заносе. При гриппе также заболеваемость регулируется уровнем коллективного иммунитета, однако в связи с изменчивостью протективных антигенов вируса гриппа сложившийся коллективный иммунитет не обеспечивает защиту от инфекций, поэтому эпидемии гриппа повторно поражают одни и те же контингенты.

Коллективный иммунитет регулирует заболеваемость и при ряде энтеровирусных инфекций, в частности при полиомиелите и гепатите А, а в эндемичных местностях – и при некоторых арбовирусных инфекциях. При указанных инфекциях целесообразна вакцинация, которая формирует необходимый коллективный иммунитет.

Среди вирусных болезней есть такие, восприимчивость к которым абсолютна и иммунитет после них сохраняется на многие годы или даже на всю жизнь (недавно ликвидированная оспа, корь, клещевой энцефалит). Существуют инфекции, восприимчивость к которым невысока, однако развивается хорошо выраженный иммунитет (полиомиелит, гепатит А, многие энтеровирусные инфекции). Встречаются инфекции, вызывающие недостаточно прочный иммунитет, в результате чего возможны повторные заболевания (парамиксовирусные, риновирусные, аденовирусные инфекции), а также инфекции, при которых иммунитет мало эффективен вследствие изменчивости возбудителя (грипп), и, наконец, инфекции хронические, при которых иммунные реакции не являются эффективными (герпетические, цитомегаловирусные, аденовирусные инфекции). Поэтому при изучении эпидемиологии вирусных инфекций важно знать иммунологический статус в отношении изучаемой инфекции. Это помогает правильно планировать и проводить профилактические прививки, как это делалось при массовой ликвидации полиомиелита, снижении заболеваемости корью, глобальном искоренении оспы.

6.6 Иммунопрофилактика вирусных инфекций

Вирусные вакцины. Вакцинация имеет большое значение в профилактике вирусных инфекций. В результате вакцинации в организме вырабатывается иммунитет, обусловленный гуморальными и клеточными факторами, и организм становится невосприимчивым к инфекции. Эффективные вакцины созданы против многих вирусных инфекций. В результате вакцинации во

всем мире ликвидирована оспа, побежден полиомиелит, ведется успешное наступление на корь, желтую лихорадку и другие инфекции.

В настоящее время известны следующие виды вирусных вакцин:

- 1) вакцины из живых аттенуированных вирусов;
- 2) корпускулярные (вирионные) убитые вакцины;
- 3) субъединичные вакцины;
- 4) генноинженерные вакцины;
- 5) синтетические вакцины.

Живые вакцины готовятся из аттенуированных вирусов, полученных разными приемами – отбором мелких колоний, ts-мутантов, адаптированных к холоду мутантов и т. п. Вакцинные штаммы должны быть генетически стабильными и не давать реверсий к дикому типу.

Живые вакцины отличаются от убитых тем, что они имитируют образование естественного иммунитета, так как при введении в организм вакцинальные штаммы размножаются, вызывая развитие вакцинальной реакции, сходной с естественным процессом, но отличающейся отсутствием или слабой выраженностью патологических явлений. Поэтому живые вакцины вызывают развитие совершенного иммунитета, сопровождающегося выработкой как гуморальных (IgG), так и секреторных (IgA) антител и появлением стимулированных Т-эффекторов и клеток памяти. Однако живые вакцины имеют ряд недостатков.

Естественной живой вакциной был вирус коровьей оспы, который Дженнер в 1796 г. привил ребенку. От англ. vacca – корова – получили свое название вакцины. Примером эффективности вакцинопрофилактики является выдающийся успех в борьбе с оспой, завершившейся ее ликвидацией во всем мире.

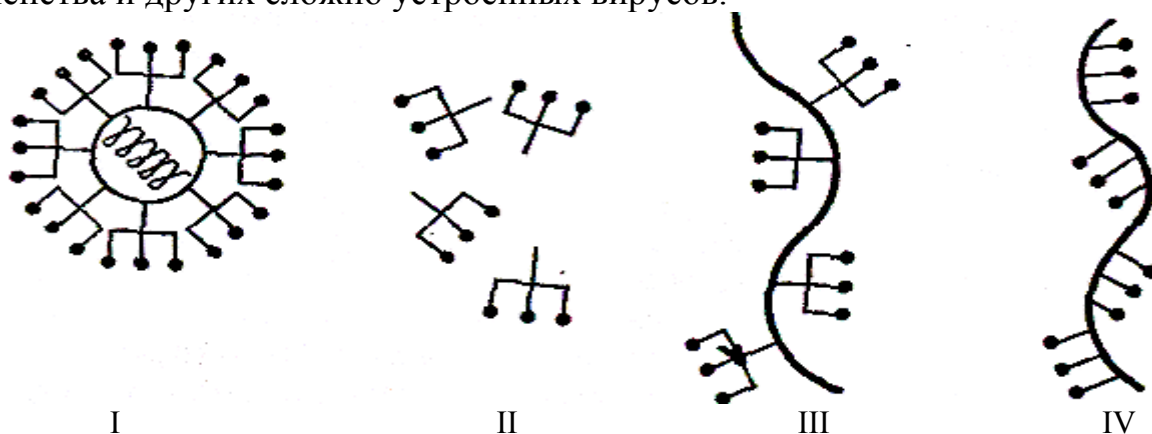
Корпускулярные убитые вакцины готовят из очищенного концентрированного вируса, инактивированного формальдегидом, аминотетрациклиновыми соединениями (соединения формальдегида с аминокислотами) или ультрафиолетовым облучением (последний метод не всегда бывает надежным). Достоинством этих вакцин является точная дозировка антигена и, следовательно, более или менее стандартный иммунный ответ. Недостатком убитых вакцин является необходимость многократного, введения и инъекционный путь введения, в результате чего не происходит образования секреторных иммуноглобулинов класса А.

К инактивированным вакцинам относятся вакцины против бешенства, полученные из мозга лабораторных животных и в культуре клеток, против гепатита В, полученная из HBs-антигена и другие.

Субъединичные вакцины. В корпускулярных вакцинах, приготовляемых из сложно устроенных вирионов, лишь поверхностные протективные антигены, составляющие обычно около 10 % вирусных белков, вызывают развитие вирусспецифического иммунитета. Остальные белки и липиды лишь усиливают реактогенность и вызывают развитие аллергических реакций. Поэтому вполне закономерным является получение субъединичных вакцин, содержащих протективные антигены. Как промежуточный этап применяются расще-

пленные (сплит) вакцины, для приготовления которых вирус обрабатывают эфиром или другими жирорастворителями, удаляя липиды. Такие вакцины менее реактогенны, нежели корпускулярные, однако в них сохранены балластные вирусные белки, не играющие роли в создании протективного иммунитета (рисунок 23).

Субъединичные вакцины лишены этих недостатков. Они готовятся следующим образом. Очищенные препараты вируса разрушают детергентами – химическими веществами, растворяющими липиды, затем отделяют поверхностные протективные антигены от нуклеокапсидов либо путем центрифугирования, либо путем хроматографии на колонках. Очищенные препараты стерилизуют и концентрируют, удаляя детергент с помощью диализа. Полученные таким путем субъединичные вакцины обладают минимальной реактогенностью, однако иммуногенные свойства их обычно слабее, чем у корпускулярных вакцин. Субъединичные вакцины приготовлены из вирионов гриппа, на очереди – субъединичные вакцины против вирусов герпеса, бешенства и других сложно устроенных вирусов.



I – вирион; II – субъединичная вакцина без носителя; III – субъединичная вакцина с носителей; IV – субъединичная вакцина на антигенных детерминант, ассоциированных с носителем иммуностимулятором.

Рисунок 23 – Принцип конструирования субъединичных и синтетических вакцин

Синтетические вакцины создают путем синтеза антигенных детерминант протективных вирусных белков. Однако чистый антиген, выделенный из состава вируса или искусственно созданный, не всегда обладает достаточной иммуногенностью, и иммунитет в ряде случаев не возникает. Антигены, вызывающие слабый иммунный ответ, должны быть конъюгированы с носителями и иммуностимуляторами, усиливающими иммунный ответ (рисунок 23).

Синтетические вакцины – представляются в виде чистых протективных антигенов, полученных путем клонирования синтезированных участков генов в клетках высших эукариотов.

Генноинженерные вакцины. Экспрессия генов инсулина, соматотропного гормона (гормона роста), интерферона человека в прокариотических системах показала широкие возможности генетической инженерии и поста-

вила на очередь задачу получения вакцин против инфекционных болезней и, в первую очередь, против вирусных инфекций.

Однако экспрессия многих вирусных генов в прокариотических системах отсутствует или незначительна в силу того, что указанные вирусы в ходе эволюции приспособились к паразитированию в организме человека и высших животных и используют для репродукции биосинтетические системы клетки хозяев, имеющие существенные отличия от биосинтетических систем прокариотов. Лишь в тех случаях, когда белки (антигены) относительно просты, возможно использование прокариотических систем. Наряду с прокариотическими системами целесообразно использование простых эукариотических систем, какими являются дрожжи. Однако и дрожжевые клетки не могут обеспечить синтез полноценных антигенов ряда вирусов человека и животных и для экспрессии их генов необходимы клетки высших эукариотов, что значительно усложнит и удорожит производство. Вакцины против полиомиелита и гриппа вряд ли будут широко производиться на перевиваемых клетках обезьян и человека методами генной инженерии, так как проще и дешевле производить эти вакцины, заражая клетки вирусом. Для вируса гепатита А этот путь наиболее перспективен в связи с трудностью накопления его в лабораторных условиях. Для вируса гепатита В генноинженерные вакцины также решают проблему контроля вакцины, требующего использования дорогостоящих пород обезьян. Получены рекомбинантные плазмиды, клонированные в кишечной палочке, однако стабильной экспрессии НВs-антигена в прокариотах подучить не удалось. Она достигнута в клетках низших эукариотов — дрожжах. Достоинством дрожжевой вакцины является ее относительно высокая иммуногенность, полная безвредность, отсутствие необходимости контроля на обезьянах, дешевизна. Экспрессия НВs-антигена осуществлена в культуре клеток млекопитающих (грызуны), и такая вакцина может конкурировать с дрожжевой.

Перспективным является также использование в качестве вектора геномов крупных ДНК-содержащих вирусов и, в первую очередь, вируса осповакцины.

Антиидиотипические антитела – это антитела к антителам против вирусных антигенов, которые по своей структуре сходны с антигенами и способны индуцировать гуморальный и клеточный иммунный ответ. Предполагается в будущем использование их в качестве эффективных и безвредных вакцин.

Указанные новые направления особенно перспективны для осуществления специфической профилактики инфекций, вызываемых вирусами, которые не культивируются в лабораторных условиях, имеют много серотипов или антигенно нестабильны и вызывают лишь кратковременный иммунитет.

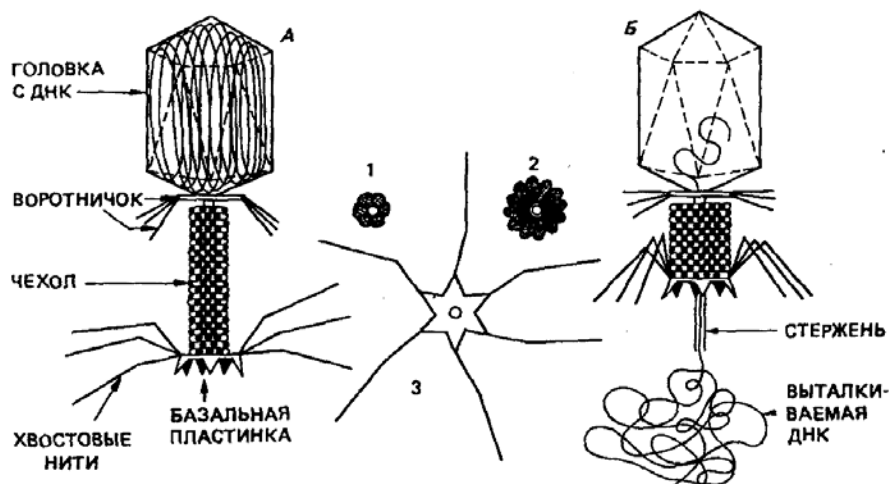
7 Бактериофаги

Выделение и выявление. Выделить бактериофаг нетрудно. Нужно лишь взять материал из естественного местообитания соответствующего вида бактерий и вместе с бактериями залить питательной средой. Если такую накопительную культуру инкубировать в условиях, благоприятных для данных бактерий, то вскоре размножатся и сохранившиеся в пробе фаги. Вирус размножается всегда только в растущих клетках. Можно путем центрифугирования или фильтрации удалить оставшиеся бактерии, а затем в надосадочной жидкости-«лизате» - определить количество фагов. Если засеять плотную питательную среду бактериальной взвесью, не содержащей фагов, то на ее поверхности образуется сплошной газон из бактерий. Если же теперь высеять суспензию, содержащую небольшое число фагов, в газоне появятся свободные от бактерий участки (стерильные пятна, или бляшки). В том месте, куда попал фаг и где он поразил бактерию, лизируется все большее число бактериальных клеток; через некоторое время инфицированная фагом область становится заметной уже невооруженным глазом как пятно, не содержащее бактерий, на фоне бактериального газона. Используя подходящие методы, можно быстро размножить бактериофаги на бактериальных газонах на твердых средах или в суспензиях бактерий. Затем отделяют бактериальные клетки центрифугированием, убивают оставшиеся бактерии хлороформом и получают таким образом фаговый лизат, содержащий обычно от 10^{10} до 10^{13} фагов в 1 мл.

7.1 Морфология бактериофагов

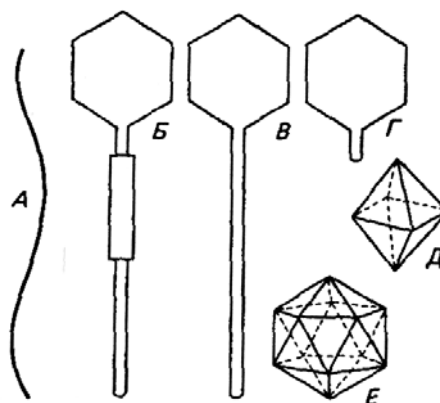
Строение бактериофагов в основном изучали на примере фагов серии Т *Escherichia coli*. Колифаг Т2 состоит из полиэдрической головки длиной 100 нм и отростка, или «хвоста», примерно такой же длины. Поэтому говорят о «составных» вирусах. Головка состоит из капсомеров и содержит внутри ДНК. Количество белка и ДНК примерно одинаково. Отросток фага Т2 имеет сложное строение. В нем можно различить не менее трех частей: полый стержень, окружающий его сократимый чехол и находящуюся на дистальном конце стержня базальную пластинку с шипами и нитями (от последних зависит специфическая адсорбция на клетке-хозяине). На электронных микрофотографиях, полученных при негативном контрастировании, можно видеть фаговые частицы в двух состояниях: у одних частиц головка очень резко выделяется на электроноплотном фоне и чехол отростка растянут, у других головка мало отличается от фона по плотности и чехол находится в сокращенном состоянии. Это схематически изображено на рисунке 24. Первое состояние (А) характерно для активного фага, в головке которого заключена ДНК, второе (Б) – для фага, который инъецировал свою ДНК в бактериальную клетку.

Многие бактериофаги имеют более простое строение. В зависимости от формы зрелых фаговых частиц различают ряд типов, которые представлены на рисунке 24. Большинство фагов содержит двухцепочечную ДНК. В последние годы, однако, было обнаружено несколько фагов с одноцепочечной ДНК и несколько с одноцепочечной РНК. Содержащие РНК фаги fr (рисунке 25, 26), R17, Q β и другие обладают наименьшими из известных геномов: в них 3500-4500 нуклеотидов.



А. Фаг с вытянутым чехлом до адсорбции. Б. Фаг с сократившимся чехлом после адсорбции и инъекции, 1-поперечный разрез вытянутого отростка: видны 6 белковых субъединиц чехла в одной плоскости; 2-поперечный разрез сократившегося чехла: видны 12 белковых субъединиц чехла в одной плоскости; 3-базальная пластинка готового к адсорбции фага со свободными нитями.

Рисунке 24 – Модель фага Т2



А. Нитевидная форма (колифаг fd). Б. Головка (гексагональный контур) с отростком и сократимым чехлом (например, колифаги Т2, Т4 и Т6). В. Головка с длинным, гибким несократимым отростком (например, колифаги Т1 и Т5). Г. Головка с коротким отростком (например, колифаги Т3 и Т7, фаг сальмонеллы Р22).

Рисунке 25 – Различные формы бактериофагов (А-Г) и геометрические формы головок фагов (Д, Е)

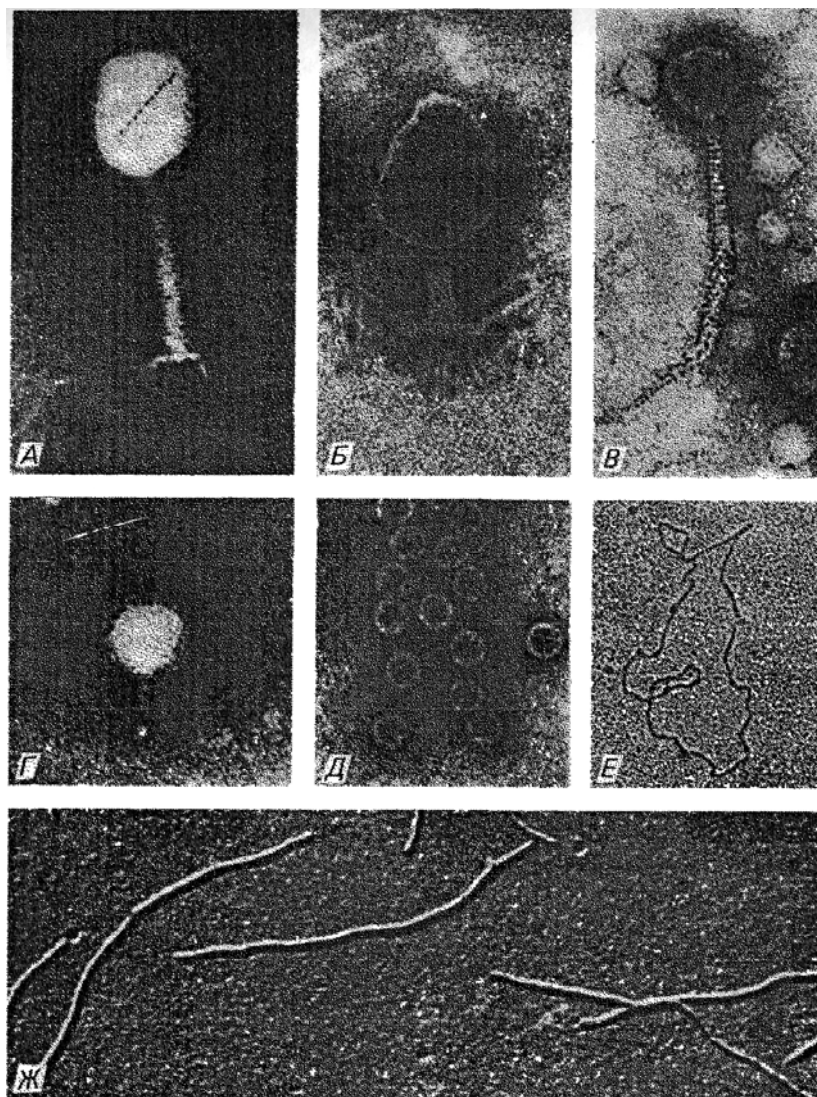


Рисунок 26 – А. Фаг T2; 168 000 х, негативный контраст (фосфорновольфрамовая кислота). Б. Фаг T2 с сократившимся чехлом и пустой головкой; 168 000 х, негативный контраст (фосфорновольфрамовая кислота). В. Фаг лямбда; 168 000 х, негативный контраст (уридилацетат). Г. Фаг T7 с коротким отростком; 168 000 х, негативный контраст (уридилацетат). Д. РНК-фаг fr; 168 000 х, негативный контраст (уридилацетат). Е. Кольцевая молекула ДНК (репликативная форма) фага fd; 50000 х, после расправления в цитохроме конусное напыление. Ж. Фаг fd с кольцевой одноцепочечной ДНК; 50 000 х, напыление под углом. (Фото Н. Frank.)

7.2 Размножение вирулентного фага

Репродукция вируса в клетке-хозяине-процесс очень сложный. Его отдельные этапы, от заражения клетки-хозяина до освобождения зрелых инфекционных частиц, довольно хорошо изучены с биохимической, генетической и морфологической стороны на примере фагов серии T (T2, T4, T6). Благоприятной предпосылкой для таких исследований явилось то, что в фаговой ДНК вместо цитозина содержится 5-гидроксиметил-цитозин, и поэтому ее синтез легко проследить по появлению этого основания. Кроме того,

можно получить мутантные формы фага, у которых та или иная стадия процесса репродукции блокирована или же протекает только в определенных условиях. С помощью таких мутантов удалось выяснить, как происходит внутри клетки-хозяина морфологическое развитие (морфопоэз) фага, т.е. в какой временной последовательности синтезируются и соединяются различные компоненты фаговых частиц.

Подобно другим вирусам, фаги неподвижны. При смешивании взвеси свободных фагов со взвесью бактерий фаговые частицы в результате случайных столкновений с клетками прикрепляются к поверхности последних (адсорбция) и вводят в клетку свою ДНК (инъекция). По прошествии некоторого времени, необходимого для процессов синтеза и созревания, клетки лизируются и новообразованные фаговые частицы выходят наружу.

Адсорбция. Не всякий фаг адсорбируется на любой бактерии. Специфичность отношений хозяина и фага определяется специфичностью адсорбции, которая зависит от рецепторов, имеющих в клеточной стенке. Рецепторы для одних фагов находятся в липопротеиновом слое, для других в липополисахаридном. Фагорезистентность некоторых бактерий определяется, вероятно, отсутствием у них соответствующих рецепторов. При избытке бактериофага на одной клетке может адсорбироваться 200-300 фаговых частиц.

Внутриклеточное развитие фага. За адсорбцией следует инъекция, т.е. введение ДНК в клетку. У фага T2 при этом базальная пластинка, по видимому, фиксируется на клетке, чехол отростка сокращается и в результате этого полый стержень входит в бактериальную клетку. Опыты с фагом, у которого нуклеиновая кислота была помечена ^{32}P , а белок - ^{35}S , показали, что в клетку проникает только нуклеиновая кислота, а белковая оболочка остается снаружи. Можно было отделить эту оболочку от зараженной клетки без всякого ущерба для размножения фага. Во время так называемого латентного периода, продолжающегося у *Escherichia coli* в среднем 25 мин, в искусственно разрушенных бактериальных клетках не удается обнаружить фага. Инъекцированная ДНК фага прежде всего вызывает полную перестройку метаболизма зараженной клетки. Сразу же прекращается синтез бактериальной ДНК. Через несколько минут прекращается также синтез бактериальной РНК и бактериальных белков, хотя общее количество белка продолжает непрерывно возрастать. Синтез ДНК возобновляется, даже с повышенной скоростью. Сначала фаговая ДНК образуется за счет распавшейся бактериальной. Эту перестройку и последующее новообразование фаговой ДНК можно количественно проследить по увеличению количества 5-гидроксиметилцитозина-основания, специфичного для ДНК некоторых T-фагов. Необходимые для синтеза фаговой ДНК ферменты образуются уже вскоре после заражения; это так называемые «ранние белки». К «поздним белкам» относятся белки оболочки и фаговые лизоцимы, или эндолизины; они образуются лишь во второй половине скрытого периода.

Заключительный процесс - *созревание* состоит в соединении фаговой ДНК с белком оболочки и образовании зрелых инфекционных фаговых частиц. Созревание T-фагов сложный многоступенчатый процесс. Сначала обра-

зуются капсиды, наполненные внутри белками. После растворения этих внутренних белков готовые головки наполняются ДНК до определенной, зависящей от типа фага плотности и закрываются. После этого пристраиваются компоненты отростка. Последовательность этих процессов можно проследить на условно летальных мутантах, у которых при 25 °С все процессы синтеза протекают нормально, а при 43 °С тот или иной этап блокируется.

В конце концов клеточная стенка бактерии размягчается под действием фагового лизоцима, и новые фаги освобождаются. Такое внезапное разрушение клетки можно наблюдать под микроскопом в условиях темного поля. Продолжительность латентного периода и величина урожая фаговых частиц варьируют в широких пределах в зависимости от вида фага, вида бактерии и условий среды. Удалось инфицировать такие бактерии, как *Haemophilus influenzae* и *Bacillus subtilis*, нативной ДНК, выделенной из бактериофага. Подобную инфекцию, соответствующую генетической трансформации, называют трансфекцией.

8 Прионы

Прионные болезни – это группа нейродегенеративных заболеваний человека и животных. Клиническая феноменология большинства из них известна давно, в то время как концепция их этиологии разработана около 20 лет назад, когда был введен термин "прион" и обнаружен прионный белок (PrP). У человека известны 4 болезни, вызываемые прионами, которые манифестируют в виде инфекционных, спорадических и наследственных форм.

Куру, регистрируемый в одном из племен Папуа Новой Гвинеи, возникает в результате употребления в пищу мозга умерших соплеменников во время ритуального каннибализма. *Болезнь Крейтцфельдта-Якоба* (БКЯ) возникает первично как спорадическое заболевание. Однако существует и ятрогенная БКЯ, развивающаяся в результате случайного инфицирования. Семейная БКЯ, *синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера* (СГШШ) и *фатальная семейная инсомния* (ФСИ) являются доминантно наследуемыми прионными болезнями, связанными с мутациями прионного гена.

В последние годы интерес к прионным болезням резко возрос в связи с эпидемией трансмиссивной спонгиозформной энцефалопатии коров ("бешенство коров") в Англии, возбудителем которой является прион. Зарегистрированы 52 спорадических заболевания новым вариантом БКЯ, в основном в Англии. Его дебют отмечался в молодом возрасте, что нетипично для этого заболевания, а при патогистологическом исследовании мозга умерших больных были выявлены изменения, сходные с таковыми при спонгиозформной энцефалопатии коров. Это дало основание предположить о возможности заражения людей через продукты, производимые из мяса этих животных. Предположение подтвердилось, когда была установлена идентичность линий прионов, выделенных от больных, с новым вариантом БКЯ, и от коров с трансмиссивной спонгиозформной энцефалопатией.

8.1 Прионы – новый класс возбудителей инфекций

Установлено, что прионы являются мелкими белковыми инфекционными частицами, устойчивыми к ферментативной инактивации. Прогресс в понимании природы прионных болезней у человека связан с изучением возможности их передачи у животных и с выделением прионного белка в результате молекулярного клонирования его гена, который картирован на коротком плече 20-й хромосомы и обозначается PRNP, а также с созданием трансгенных мышей, экспрессирующих мутировавший PRNP.

Прионный белок в очищенных прионных препаратах скрепи обозначили PrP^{Sc} в отличие от нормальной клеточной изоформы PrP^C. От PrP^C PrP^{Sc} отличается своей высокой резистентностью к действию протеаз, нерастворимостью после экстракции, способностью накапливаться во вторичных лизосомах, посттрансляционным синтезом и обогащением в процессе выделения. На основании анализа фрагмента PrP^{Sc}, резистентного к

действию протеазы К, идентифицированы по меньшей мере 2 гликоформы этого белка (PrP^{res}).

Прионный белок контагиозен независимо от причин его возникновения. Это установлено экспериментальными исследованиями, когда животные заболели при инокуляции экстракта мозга больных, умерших не только от инфекционных прионных болезней, но и от спорадических и наследственных их форм. Экспериментально прионными инфекциями было заражено 18 животных куру, 278 – различными формами БКЯ, 4 – СГШШ и несколько – ФСИ и спорадической фатальной инсомнией. При этом патологическая PrP изоформа образуется путем конформации PrP^{C} хозяина в PrP^{Sc} . Это отличает их от вирусных белков, которые кодируются вирусным геномом.

Трансмиссивные прионы состоят главным образом, если не целиком, из PrP^{Sc} . Хотя PrP^{Sc} синтезируется из клеточного PrP (PrP^{C}) в результате посттрансляционного процесса, окончательно неясно, происходит ли превращение PrP^{C} в PrP^{Sc} в результате неизвестной химической модификации либо возникает лишь вследствие конформационных изменений. В опытах с использованием мышей, дефектных по наличию PrP^{C} , показано, что чувствительность к инфекции PrP^{Sc} зависит от присутствия PrP^{C} , которое является обязательным условием развития патологического процесса, возникающего в результате инфицирования.

Исследования трансгенных мышей показали, что синтез прионов, инкубационный период при скрепи и гистопатологические изменения значительно зависят от селективного взаимодействия инокулированных прионов с PrP субстратом, синтезируемым хозяином. Считается, что биосинтез прионов является экспоненциальным процессом, в котором посттрансляционная конформация PrP^{C} или предшественника PrP^{Sc} является обязательным этапом.

Полагают, что молекула PrP^{Sc} соединяется с молекулой PrP^{C} для образования гетеродимерного промежуточного продукта, который трансформируется в 2 молекулы PrP^{Sc} . В следующем цикле каждая из 2 PrP^{Sc} молекул соединяется с PrP^{C} молекулой, давая начало 4 PrP^{Sc} молекулам. В 3-м цикле каждая из 4 молекул PrP^{Sc} связывается с молекулой PrP^{C} , давая начало 8 молекулам PrP^{Sc} , что и обеспечивает экспоненциальный рост.

Положение о том, что синтез PrP^{Sc} – посттрансляционный процесс, подтверждается результатами изучения меченых скрепи-инфицированных клеточных культур. Показано, что PrP^{C} синтезируется и распадается быстро, в то время как PrP^{Sc} синтезируется медленно в результате еще окончательно неидентифицированного посттрансляционного процесса.

Эти наблюдения соответствуют ранее полученным данным, показавшим, что PrP^{Sc} накапливается в мозгу инфицированных вирусом скрепи животных, в то время как уровень PrP мРНК остается неизменным. Кроме того, структура и организация PRNP таковы, что наиболее вероятно образование PrP^{Sc} в результате посттрансляционного процесса.

Появляясь, обе PrP изоформы проходят через аппарат Гольджи, где их Asp-связанные олигосахариды модифицируются. PrP^C в основном транспортируется секреторными пузырьками к наружной поверхности клетки, где оседает, связываясь с гликозилфосфатидинозитолом. В отличие от PrP^C PrP^{Sc} накапливается первично в пределах клетки, где откладывается в цитоплазматических пузырьках, многие из которых являются вторичными лизосомами. В последующем PrP^{Sc} высвобождается во внеклеточное пространство и откладывается в амилоидных бляшках.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что прионные болезни возникают в результате накопления PrP^{Sc}, а не подавления функции PrP^C. Механизмы взаимодействия PrP^{Sc} и нейрона недостаточно изучены. Имеются данные о том, что события, связанные с реализацией функции как PrP^C, так и PrP^{Sc}, очевидно, происходят в мембране.

Так, при изучении свободной клеточной трансляции выявлено 2 формы PrP^C: трансмембранной и секреторной. Видимо, мембранозависимые процессы важны для синтеза PrP^{Sc}, так как брефелдин А, селективно разрушающий вещества, депонированные в аппарате Гольджи, препятствует синтезу PrP^{Sc} в инфицированных скрепи культурах клеток.

В действительности связь инфекционности скрепи с мембранными фракциями известна довольно давно. Считается, что гидрофобные взаимодействия определяют многие физические свойства, проявляемые инфекционными прионными частицами. В последние годы получены данные о том, что в реализации взаимодействия PrP^{Sc} и нейрона имеют значение экзайто-токсические механизмы.

8.2 Классификация прионных болезней

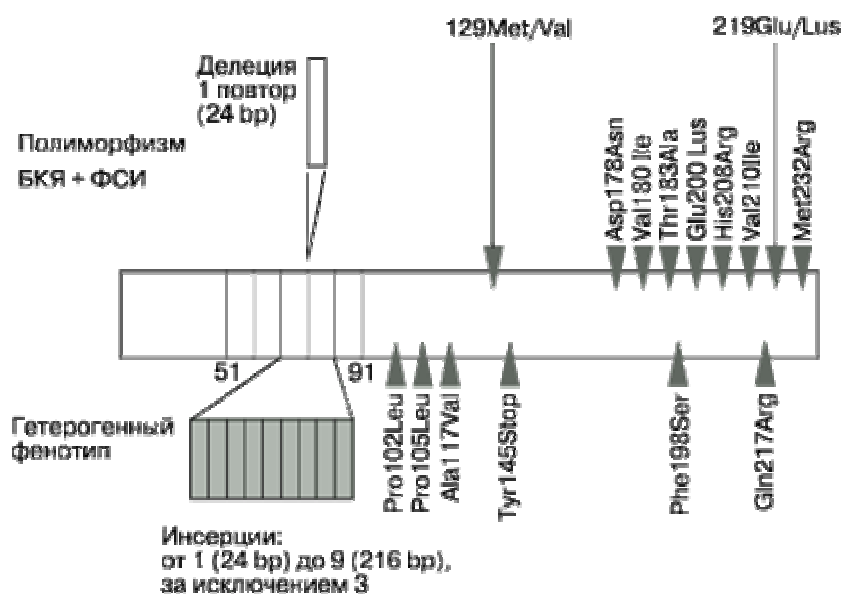
Таблица 4 – Классификация прионных заболеваний

Заболевание	Носитель	Название приона	PrP изоформа
Скрейпи	овцы и козы	Прион скрейпи	OvPrP ^{Sc}
Трансмиссивная энцефаломиопатия норок (ТЭН)	Норки	Прион ТЭН	MkPrP ^{Sc}
Chronic wasting disease (CWD)	Олени	CWD прион	MDePrP ^{Sc}
Губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭКРС)	Коровы	Прион ГЭКРС	BovPrP ^{Sc}
Губчатая энцефалопатия кошачьих (ГЭК)	Кошки	Прион ГЭК	FePrP ^{Sc}
Куру	Люди	Прион куру	HuPrP ^{Sc}
Болезнь Крейцфельда-Якоба (БКЯ)	Люди	Прион БКЯ	HuPrP ^{Sc}
Синдром Герстманна—Штройслера—Шейнкера (GSS)	Люди	GSS прион	HuPrP ^{Sc}
Хроническая семейная бессонница (ХСБ)	Люди	Прион ХСБ	HuPrP ^{Sc}

Куру, ятрогенная форма и новый вариант БКЯ манифестируют как инфекции. Семейные формы БКЯ, СГШШ и ФСИ начинаются как наследственные болезни. Эти две группы заболеваний составляют не более 10% от числа всех наблюдений прионных болезней. Основная масса больных (90%) регистрируется как спорадическая форма БКЯ с частотой 1:1 000 000 в популяции.

8.3 Генетика прионных болезней

Всего обнаружено более 20 мутаций PRNP, достоверно связанных с наследственными прионными болезнями. Точечные мутации в кодонах 178, 180, 183, 200, 208, 210 и 232, а также 8-членные аминокислотные повторы в кодонах 51 – 91 связаны с семейной БКЯ, точечные мутации в кодонах 102, 105, 117, 145, 198 и 217 – с синдромом СГШШ, в кодоне 178 – с ФСИ (рисунок 27).



bp – пара оснований, Ala – аланин, Arg – аргинин, Asn – аспарагин, Asp – аспартаговая кислота, Gln – глицин, Glu – глютамат, His – гистидин, Ile – изолейцин, Leu – лейцин, Lys – лизин, Met – метионин, Phe – фенилаланин, Pro – пролин, Ser – серин, Thr – триптофан, Tyr – тирозин, Val – валин, БКЯ – Болезнь Крейтцфельдта-Якоба, ФСИ – фатальная семейная инсомния, СГШШ – Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера. Открытая рамка считывания гена (кодирующий участок) обозначена в виде прямоугольника. Над ним показан полиморфизм нормального гена по кодонам 129 и 219. Отмечены точечные мутации, характерные для наследственных форм прионных болезней человека (БКЯ и ФСИ вверху и СГШШ – внизу), инсерции и делеции.

Рисунок 27 – Ген прионного белка человека – мутации и полиморфизм

Описанные мутации предположительно вызывают конформационные превращения PrP^C белка. При спорадической БКЯ не обнаружено специфических мутаций PrP. Генетический полиморфизм в кодоне 129, кодирующем метионин и валин, может влиять на восприимчивость к инфекционным прионным болезням.

Так, у части больных с ятрогенной БКЯ, возникшей в результате заражения через экстракт гормона роста, была выявлена гомозиготность по валину в кодоне 129 PrP, в то время как при заражении в результате пересадки твердой мозговой оболочки выявляется гомозиготность как по валину, так и по метионину. С другой стороны, гомозиготность по этому кодону связана с более ранним началом наследственных форм БКЯ. Полиморфизм кодона 129 влияет на фенотипические особенности всех семейных форм прионных болезней.

8.4 Морфология

Результаты патоморфологического исследования мозга больных, погибших от прионных болезней, показали черты сходства и различия. Макроскопически определяется атрофия головного мозга, особенно значительная при БКЯ, степень которой влияет на продолжительность выживания. Гистологически выявляются спонгиозформная дегенерация, атрофия и утрата нервных клеток, астроцитарный глиоз, амилоидные бляшки, содержащие прионный белок, а также отсутствие воспалительных реакций.

При БКЯ указанные изменения регистрируются в коре головного мозга, стриатуме, таламусе, молекулярном слое мозжечка и верхней части ствола мозга, причем амилоидные бляшки обнаруживались в 5-10% случаев.

Новый вариант БКЯ характеризуется:

- амилоидными бляшками, окруженными вакуолями;
- спонгиозформными изменениями, больше проявляющимися в базальных ганглиях;
- выраженным таламическим астроглиозом;
- скоплением прионного белка, включая внутриклеточные отложения в церебральной и мозжечковой коре, особенно в молекулярном слое.

Патоморфологический диагноз СГШШ основывается на выявлении характерных амилоидных бляшек, дегенерации белых проводниковых систем, преимущественно спиноцеребеллярных трактов, и утраты нейронов по всему мозгу. При этом с разной частотой и степенью выраженности могут присоединяться спонгиозформные изменения и глиоз. Амилоидные бляшки при СГШШ чаще обнаруживаются в мозжечке.

При ФСИ отмечаются атрофия переднего и медиодорсального ядер таламуса, олив, различная степень глиоза церебральной и мозжечковой коры, отсутствие бляшек, нерезко выраженные спонгиозформные изменения.

Патоморфологические диагностические критерии для трансмиссивных спонгиозформных энцефалопатий человека унифицированы. При БКЯ

(спорадической, ятрогенной или семейной) наблюдается спонгиозная энцефалопатия в коре головного мозга и коре мозжечка и подкорковом сером веществе, а также и/или энцефалопатия с PrP иммунореактивностью, при СГШШ – энцефало(миело)патия с мультицентрическими PrP бляшками, при ФСИ – дегенерация таламуса, различные спонгиозные изменения в головном мозге.

Следует отметить, что ткани погибших от прионных болезней остаются контагиозными даже после их фиксации формалином.

Болезнь Крейтцфельдта-Якоба

Продромальные симптомы БКЯ, самой распространенной из указанной группы болезней, неспецифичны и возникают примерно у 30 % больных. Они появляются за недели и месяцы до возникновения первых признаков деменции и включают астению, нарушения сна и аппетита, внимания, памяти и мышления, снижение массы тела, потерю либидо, изменение поведения.

Для первых признаков заболевания обычно характерны зрительные нарушения, головные боли, головокружение, неустойчивость и парестезии. У основной части больных постепенно развивается БКЯ, реже – острый или подострый дебют. Обычно болезнь начинается в возрасте 50-65 лет. Несколько чаще болеют мужчины.

Клинической тетрадой БКЯ являются подострая прогрессирующая деменция, миоклонии, типичные периодические комплексы на *электроэнцефалограмме* (ЭЭГ) и нормальный ликвор. Наряду с этим наблюдаются мозжечковые симптомы, расстройство зрительного восприятия, надъядерные глазодвигательные нарушения, а в далеко зашедших стадиях – припадки, экстрапирамидные и пирамидные нарушения, переднероговые симптомы. Большинство больных погибает в первый год болезни, редко – в течение 2 лет и позже.

Новый вариант БКЯ характеризуется более ранним, чем обычно, началом. Возраст больных колеблется от 16 до 40 лет. Между тем классическая БКЯ очень редка в возрасте до 40 лет – не чаще 2-3 %. Клинически при новом варианте БКЯ в дебюте отмечаются психические нарушения в виде тревоги, депрессии, изменений поведения, реже – дизестезии лица и конечностей. Спустя недели и месяцы присоединяются неврологические нарушения, в основном мозжечковые. На поздних этапах болезни отмечаются нарушения памяти, деменция, миоклонии или хорей, реже – пирамидные симптомы. На ЭЭГ отсутствуют характерные для БКЯ изменения.

До недавнего времени кроме биопсии мозга с последующим исследованием биоптата на наличие прионного белка не существовало специфической диагностики БКЯ. Однако в последние годы для этих целей используется биопсия глоточной миндалины. Имеются сообщения о диагностике БКЯ с помощью моноклональных антител.

Наибольшее диагностическое значение из других методов исследования имеет ЭЭГ, при которой выявляется повторяющаяся трифазная и полифазная активность длительностью менее 200 мкВ, возникающая каждые 1-2

с. При компьютерной томографии головного мозга может определяться корковая атрофия. При магнитно-резонансной томографии иногда выявляются гиперинтенсивные сигналы в проекции базальных ганглиев или таламуса, при позитронной эмиссионной спектроскопии – региональное снижение метаболизма глюкозы, коррелирующее с патоморфологическими изменениями. Определенное диагностическое значение имеет обнаружение в ликворе больных БКЯ патологических белков 26 и 29 кДа и нейрональной специфической энolahзы, особенно белка 14-3-3. Причем последний рассматривается в качестве маркера прионных болезней.

С целью прижизненной диагностики БКЯ и других прионных болезней человека и животных в России используется оригинальный метод индикации изменений в перевиваемых клетках нейроглии, вызываемых PrP^{Sc}, а также исследование антител к нейрофиламентам.

Клинический диагноз БКЯ обычно основывается на наличии следующих симптомов: деменции, миоклонуса и периодических электрических всплесков на ЭЭГ у нелихорадящего 60-летнего больного. Наличие лихорадки, повышения СОЭ, лейкоцитоз в крови или плеоцитоз в ликворе должны настораживать врача в отношении иной этиологии заболевания центральной нервной системы.

Обращают на себя внимание клинические и патоморфологические особенности при семейной БКЯ, связанные с характером мутации. Так, при мутации в кодоне 178 происходит замена аспартата на аспарагин, что клинически характеризуется ранним началом болезни, относительно длительным течением (до 2 лет), нарушением памяти на ранних этапах патологического процесса, миоклонусом, отсутствием типичных изменений на ЭЭГ.

В случаях мутации в кодоне 200 (замена глутаминовой кислоты на лизин) клинически отмечается схожесть со спорадической БКЯ, но при морфологическом исследовании редко выявляются амилоидные бляшки. При 8-членных аминокислотных повторах отмечаются раннее начало (25-35 лет), асоциальное поведение, нарушения речи, координации движений и когнитивных функций, редко миоклонус и изменения на ЭЭГ. С увеличением числа повторов нарастает тяжесть клинических и морфологических изменений (при вставке с 10-11 повторами нарушения минимальны, при 12 повторах картина напоминает спорадическую БКЯ, при 13 и 14 повторах она сходна с СГШШ).

В документированных наблюдениях случайной передачи БКЯ инкубационный период составлял 1,5-2 года. Однако при передаче болезни через зараженные инструменты и при пересадке тканей инкубационный период может длиться до 10 лет. Причем БКЯ в этих случаях манифестирует в первую очередь нарушениями интеллекта.

Ятрогенная БКЯ, приобретенная при лечении экстрактами тканей, содержащими гормон роста и гонадотропин, проявляется мозжечковыми симптомами с более продолжительным инкубационным периодом – 5-17 лет (границы разброса – 4-30 лет).

В последние годы диагностика БКЯ унифицирована. В соответствии с этим выделяют достоверную, вероятную и возможную БКЯ.

Достоверный диагноз БКЯ устанавливается с помощью стандартных патоморфологических методов и в соответствующих лабораториях с помощью дополнительных методов (PrP иммунохимические методы, западный блоттинг и/или выявление скрепиассоциированных фибрилл). Остальные случаи БКЯ трактуются как вероятные или возможные.

Вероятный диагноз sporадической БКЯ основывается на прогрессирующей деменции и типичных изменениях на ЭЭГ, а также на наличии 2 из следующих клинических признаков: миоклонуса, зрительных или мозжечковых нарушений (атаксии), пирамидных или экстрапирамидных нарушений, акинетического мутизма.

При *возможной* БКЯ имеются те же критерии, что и при вероятном БКЯ, но при отсутствии изменений на ЭЭГ и при длительности болезни менее 2 лет.

Приобретенная БКЯ регистрируется при прогрессирующем мозжечковом синдроме у больного, получавшего гормоны гипофиза, а также при sporадической БКЯ, если в анамнезе имелись ситуации риска возникновения болезни, например, при трансплантации твердой мозговой оболочки или роговицы.

Семейная форма БКЯ регистрируется в случае достоверного или возможного диагноза БКЯ в сочетании с достоверным или возможным диагнозом БКЯ у ближайшего родственника, а также при нейропсихических нарушениях, сопряженных со специфическими для заболевания мутациями PrP гена, выявляемыми при исследовании лейкоцитов больных.

Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера

СГШШ описывается как семейное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, в популяции регистрируется с частотой 1 случай на 10 000 000 населения. Болезнь начинается на 3-4-м десятилетии жизни и продолжается в среднем 5 лет.

Начальными симптомами СГШШ являются мозжечковые нарушения, позже присоединяется деменция, которая иногда может и не проявляться. В развернутой стадии болезни преобладают мозжечковые симптомы, но в некоторых семьях ведущими признаками могут быть экстрапирамидные нарушения, в других – параличи зрения, глухота и слепота. Характерно отсутствие сухожильных рефлексов на нижних конечностях при наличии разгибательных патологических знаков. Редко наблюдаются миоклонии.

Для большинства генетических подтипов СГШШ характерна замена пролина на лейцин в кодоне 102 PrP гена. Клинически они характеризуются мозжечковой атаксией, миоклониями, афазией, аграфией, агнозией, пирамидными парезами, амиотрофиями, фасцикуляциями. Деменция развивается поздно.

Морфологически отмечаются амилоидные бляшки, негрубые спонгиозоформные изменения, атрофия проводниковых систем спинного мозга и мозгового ствола, а также подкорковых ядер. Мутация в кодоне 105 (замена

пролина на лейцин) зарегистрирована в Японии. У этих больных определяются спастический паразетез, эмоциональная слабость; морфологически – амилоидные бляшки в коре головного мозга, реже в мозжечке и подкорковых ядрах, грубый глиоз.

Замена аланина на валин в кодоне 117 отмечена в одной из азиатских семей и в американской семье немецкого происхождения. Для этих семей характерно нарастание с каждым поколением выраженности психических нарушений, пирамидной недостаточности и морфологических проявлений (амилоидные бляшки, нейрональная дегенерация, умеренные спонгиозоформные изменения).

В семье из Индианы (США) описана мутация в кодоне 198 (замена фенилаланина на серин), которая клинически характеризуется деменцией, атаксией, паркинсонизмом, параличом зрения на ранней стадии болезни; морфологически – амилоидными бляшками, нейрофибрилярными сплетениями, легкими спонгиозоформными изменениями.

Мутация в кодоне 217 (замена глутамина на аргинин) описана в шведской семье. Клинически развивалась деменция, позже – атаксия, дисфагия, спутанность сознания; морфологически – нейрофибрилярные сплетения в *neocortex*, амилоидные бляшки в церебральной и мозжечковой коре.

Фатальная семейная инсомния

ФСИ – аутомно-доминантное заболевание, характеризующееся некурабельной прогрессирующей бессонницей, симпатической гиперактивностью (гипертензией, гипертермией, гипергидрозом, тахикардией), тремором, атаксией, гиперрефлексией, миоклониями, нарушениями внимания, памяти, дезориентацией, галлюцинациями.

Болезнь начинается в возрасте от 25 лет до 71 года. У больных нарушены циркадианные ритмы секреции мелатонина, пролактина, гормона роста, АКТГ и кортизола. У всех описанных больных (около 40) выявлена мутация в кодоне 178. Установлены 2 фенотипа ФСИ, обусловленные гаплотипом кодона 129 в нормальном аллеле (129 Met/Met или 129 Met/Val), которые отличаются по клиническим и патологоанатомическим признакам.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что та же мутация описана и при семейной БКЯ. Два различных по фенотипу заболевания связаны с одной патогенной мутацией, которая характеризуется общим полиморфизмом в кодоне 129 (Met/Val). Это связывают с тем, что фенотипы данных заболеваний обусловлены кодоном 129 мутантного аллеля, которые в связи с мутацией Asp178Asn приводят к экспрессии PrP^{res}, отличающихся по биофизическим параметрам.

В последние годы описано 5 спорадических случаев ФСИ без мутации в кодоне 178, но с характерными для нее изменениями в головном мозге.

Куру

Куру – заболевание, сыгравшее главную роль в развитии концепции трансмиссивных спонгиозоформных энцефалопатий человека.

Для куру характерны атаксия, тремор и деменция. Смерть наступает примерно через 12 мес. Однако в настоящее время это заболевание имеет скорее исторический интерес, поскольку традиции каннибализма у племен восточных высокогорий Новой Гвинеи исчезли.

8.5 Изоформы прионов

Вариабельность проявлений прионных болезней ставит вопрос о возможности существования различных линий прионов. Это предположение вытекает не только из разнообразия клинических синдромов, но и в связи с неодинаковым инкубационным периодом и различной патоморфологической картиной прионных болезней. Для объяснения этого обстоятельства предложено 2 гипотезы.

Первая утверждает, что соответствующая специфическая информация кодируется третичной и четвертичной структурами PrP^{Sc}. Поскольку в процесс размножения прионов включается образование промежуточного продукта, то есть комплекса PrP^C/PrP^{Sc}, было высказано предположение, что специфическая для линии (изолята) информация содержится в третичной структуре PrP^{Sc}. Однако эта гипотеза подразумевает, что число различных конформаций PrP^{Sc} ограничено.

Альтернативная гипотеза предполагает, что различие прионов происходит из гликоформ PrP^{Sc}. Эта гипотеза более привлекательна, так как различий PrP^{Sc} гликоформ достаточно для объяснения большого числа линий прионов, и к размножению определенного изолята прионов может привести синтез молекул PrP^{Sc} в пределах ограниченной субпопуляции клеток [10]. Эта гипотеза не только подтверждается результатами ряда экспериментов, но также объясняет, как каждый прионный изолят проявляет свои специфические черты, такие, как инкубационный период, особенности патоморфологических изменений и характер накопления PrP^{Sc}.

8.6 Прионы и видовой барьер

Следует отметить, что замена аминокислот в PrP приводит не только к врожденным прионным болезням. С ними связано существование и видовых барьеров. В последние годы появились прецеденты прорыва этого барьера. Так, прионные заболевания стали регистрироваться у животных, у которых в обычных условиях эта патология не наблюдается (у содержащихся в неволе обезьян и жирафов), что связывается с их кормлением продуктами, из тканей животных – традиционных носителей патологической формы прионного белка (овцы, козы).

Теоретически и практически важный вопрос о наличии видového барьера и о возможности межвидового переноса прионных инфекций обсуждается в литературе. Указывается, что на межвидовой перенос инфекта влияют два фактора:

1) эффект вида донора, связанный с различиями в последовательностях гена PrP у двух видов – донор-реципиент;

2) штаммовые особенности приона, влияющие на легкость или сложность преодоления межвидового барьера.

Существование высокоэффективного видового барьера между крупным рогатым скотом и человеком не может исключить переноса инфекции у немногих людей.

Клиническое, гистологическое и электронно-микроскопическое изучение инфекционного процесса у норок, являющихся природным хозяином возбудителя, и инфекционного процесса, вызванного у норок заражением агентом скрепи (природный хозяин – овца), показало сходство по всем изучаемым параметрам.

Пассирование агентов трансмиссивных энцефалопатий от одного вида к другому может также непредсказуемо изменить инфекционный спектр каждого конкретного приона.

8.7 Устойчивость прионов

Прионы очень стойки к обычным методам дезинфекции. Ионизирующее, ультрафиолетовое или микроволновое излучение на них практически не действует. Дезинфекционные средства, обычно используемые в медицинской практике, действуют на них лишь в очень ограниченной мере. Надежно их ликвидируют дезинфицирующие реактивы — сильные окислители, разрушающе действующие на протеины.

Другое затруднение представляет собой стойкость прионов к высоким температурам. Даже при автоклавировании при 134 °С в течение 18 минут невозможно достичь полного разрушения прионов, и прионы «выживают» в форме, способной вызвать заражение. Стойкость к высоким температурам еще более возрастает, если прионы засохнут на поверхности металла или стекла или если образцы перед автоклавированием были подвергнуты действию формальдегида.

В Великобритании, где *новый вариант* является очень серьезной проблемой, по этим причинам уже используются одноразовые хирургические инструменты для тонзиллэктомии. В будущем напрашивается альтернативное решение: создания новых инструментов, с учётом повышенных требований к очистке и обеззараживанию. Одноразовое использование инструментов согласно принципам ВОЗ требуется в случае стоматологического обслуживания пациентов с диагностированным прионным заболеванием или в случае подозрения на него.

Намного более сложным решением этой проблемы является лечение пациентов группы риска. К ним относятся пациенты, которые подверглись операциям, при которых была использована потенциально зараженная твердая мозговая оболочка, или пациенты из семей с наследственной формой болезни Крейтцфельдта-Якоба. ВОЗ в этом случае не требует никаких специальных мер. Британский Консультационный научный комитет по губчатой

энцефалопатии в своем решении в 1998 г. счел возможным ограничиться более тщательной очисткой и обеззараживанием инструментов, в сочетании с более длительным автоклавированием.

Потенциальная опасность для человека

Несмотря на незначительное количество явных случаев прионных заболеваний у людей, многие специалисты считают, что имеется высокая степень опасности «медленных» инфекций для человека.

Имеются данные, что источником распространения могут быть стоматологические процедуры, связанные с попаданием прионов в кровяное русло.

Под подозрение попал также лецитин животного происхождения, что вызвало сокращение применения его в фармакологической промышленности, и вытеснение растительным (в основном, соевым) лецитином.

Исследования прионов дрожжей и др. микромицетов

Прион-подобные белки, поведение которых подобно поведению PrP найдены в природных популяциях микромицетов и дрожжей. Исследования прионов дрожжей подтвердили гипотезу о том, что превращение белков в прионное состояние зависит только от белков. Было показано, что прионы, экстрагированные из клеток, могут служить «семенами» образования прионов в пробирке. Одним из наиболее хорошо изученных белков, склонных к образованию прионов у дрожжей — фактор терминации трансляции (eRF3), который образует так называемые PSI+ клетки. Такие клетки имеют изменённое физиологическое состояние и изменённый уровень выражения некоторых генов, что позволило выдвинуть гипотезу о том, что у дрожжей образование прионов может играть адаптивную роль.

Список использованных источников

- 1 **Букринская А.Г.** Вирусология / А.Г. Букринская – М.: Медицина, 1986. – с. 5-159.
- 2 **Вирусология.** / под ред Б. Филдса, Д. Найпа, пер. с англ. А.В. Гудкова, Е.И. Склянковой, К.М. Чумакова под ред. Н.В. Каверина, Л.Л. Киселева. – М.: Мир, 1989. – Т. 1-3.
- 3 **Медицинская вирусология.** / под ред. А.М. Кролюка, В.Б. Сбойчакова – Санкт-Петербург.: ЭЛБИ-СПб, 2002. – с. 7-68
- 4 **Медицинская микробиология** / под ред. В.И. Покровского, О.К. Позднеев – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – с. 631-739
- 5 **Зуев В.А.** Медленные вирусные инфекции человека и животных. / В.А. Зуев – М.: Медицина; 1988. – с. 50-63.
- 6 **Зуев В.А.** Прионные болезни человека и животных. Руководство для врачей. / В.А. Зуев, И.А. Завалишин, В.М. Ройхель – М.: Медицина; 1999. – с. 7-26.
- 7 **Завалишин И.А.** Синдром Герстманна-Штреусслера: новые возможности диагностики. И.А. Завалишин, Л.С. Адарчева, В.М. Ройхель, с соавт. Журн невропатол и психиатр 1995; № 1 с. 58-63.
- 8 **Шкундина И.С.** Прионы. / И.С. Шкундина, М.Д. Тер-Аванесян // Успехи биологической химии. – 2006 – Т. 46.
- 9 **Palmer M.S.,** Prion diseases: an introduction. / M.S. Palmer, J. Collinge In: editors. Prion Diseases. – Oxford: Oxford University Press; 1997.
- 10 **Prusiner S.B.** Human prion diseases and neurodegeneration: prions, prions, prions./ S.B. Prusiner – Berlin. Heidelberg; 1998. p.1-17.
- 11 **Korczyn A.D.** Human prion diseases. / A.D. Korczyn Proceedings of 49th Annual meeting of American Academy of Neurology; 1997 Apr 12-19, Boston, MA. p.1-19.
- 12 **Chazot G.** Kopp N. New variant of Creutzfeld-Jacob Disease in a 26-year-old French man. Lancet 1996; 347:1181.
- 13 **Will R.G.** A new variant of Creutzfeldt-Jacob Disease in the UK. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., et al. Lancet 1996; 347:921-5.
- 14 **Bruce M.E.** Transmissions to mice indicate that "new variant" Creutzfeldt-Jacob disease is caused by the BSE agent. Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell J., et al. Nature 1997; 389:498-501.

15 **Hill A.F.** Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jacob disease by tonsil biopsy. Hill A.F., Zeidler M., Ironside J., Collinge J. *Lancet* 1996; 347:921-5.

9 **Brandner S.** Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. Brandner S., Iseman S., Raeber A., et al. *Nature* 1996; 379:339-40.

10 **Prusiner S.B.** Prions causing neurodegenerative diseases of humans and animals. In: Jolles G., Stutzmann J.M., editors. *Neurodegenerative diseases*. Acad Press; 1996. p.23-80.

13 **Ironside I.W.** Human prion diseases. *J Neural Transm* 1996; 47:231-46.

14 **Prusiner S.B.** Human prion diseases and neurodegeneration. *Cur Topics in Microb Immunol* 1996; 207:1-17.

15 **Gambetti P.** Human prion diseases. *Proceedings of the 49th Annual meeting of American Academy of Neurology*; 1997 Apr 12-19; Boston, MA. p.43-62.

16 **Alperovitch A.** Epidemiology of Creutzfeldt-Jacob disease – past and present uncertainties. *Eur J Neurol* 1996; 3:500-6.

17 **Bell J.** Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. Bell J., Ironside J. *Br Med Bull* 1993; 49:738-77.

18 **Budka H.** Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (Prion diseases). Budka H., Aguzzi A., Brown P. *Brain Pathol* 1995; 5:459-66.

19 Report of a WHO Consultation on Clinical and Neuropathological Characteristics of the New Variant of Creutzfeldt-Jacob disease and other Human and Animal Transmissible Spongiform encephalopathies; 1996, 1997, 1998, Geneva.

20 **Jaroslav Petr, DrSc.** Phony a ustni dutina. *Progresdent*, 2004, № 2, s. 12-16

20 **Matsuda H.** Chicken monoclonal antibodies with specificity for the N-terminal of human prion protein. *FIMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23:189-94.

21 **Hsich G.** The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. Hsich G., Kenney K., Gibbs C.J., Lee K.H., Harrington M.G. *N Engl J Med* 1996; 335:924-30.

23 **Medori R.** Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. Medori R., Tritchler H-J., LeBlanc A., et al. *N Engl J Med* 1992; 326:444-9.

24 **Gambetti P.** Insomnia in prion diseases: sporadic and familial. Gambetti P., Parchi P. *N Engl J Med* 1999; 340:1675-7.

25 **Gajdusek D.C.** Infectious amyloids: subacute spongiform encephalopathies as transmissible cerebral amyloidoses. In: Fields B.N., et al., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1996. p.2851-900.

26 **Collinge J.** Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. Collinge J., Palmer M.S., Sidle K.C., et al. *Nature* 1995; 378:779-83.

27 **Cousens S.N., et al.** Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 1997; 385:197-8.