

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Вятский государственный университет»

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

**К.Е.Гаврилов**

**КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ВИРУСОЛОГИИ**

Для студентов, обучающихся по направлению 020400 «Биология»

КИРОВ – 2011

Рекомендовано к изданию методическим советом  
биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ»

Допущено редакционно-издательской комиссией методического совета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебного пособия для студентов направления подготовки 020400 «Биология», бакалавриат, профиль подготовки «Микробиология»

Рецензент: Д.В. Боровской, к.б.н., научный сотрудник ФГКУ «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт Министерства обороны Российской Федерации»

**Гаврилов К.Е.**

Курс лекций по вирусологии: учебное пособие для студентов  
направления 020400 «Биология», бакалавриат, профиль подготовки  
“Микробиология” / К.Е. Гаврилов – Киров: ПРИП ФГБОУ ВПО  
«ВятГУ», 2011. – 103 с.

В издании излагаются основы вирусологии в виде курса лекций. Курс формирует у обучающегося целостное представление о современной вирусологии; знакомит с фундаментальными разделами вирусологии, необходимыми для последующего их глубокого изучения в рамках общепрофессиональных дисциплин, в том числе со свойствами живых систем, основными концепциями и методами биологических наук, основами цитологии, способами и формами размножения, закономерностями наследственности и изменчивости, стратегиями сохранения биоразнообразия и охраны природы.

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Наука вирусология
  - 1.1 Развитие учения о вирусах
  - 1.2 Вирусология как биологическая наука
  - 1.3 Связь вирусологии с другими биологическими науками
  - 1.4 Природа вирусов
  - 1.5 Основные группы вирусов
2. Химический состав и физическая структура вирусов
  - 2.1 Химический состав вирусов
  - 2.2 Вирусные нуклеиновые кислоты
    - 2.2.1 Вирусные ДНК
    - 2.2.2 Вирусные РНК
  - 2.3 Вирусные белки
  - 2.4 Вирусные липиды
  - 2.5 Вирусные углеводы
  - 2.6 Структура вирусов
    - 2.6.1 Вирусы с кубическим типом симметрии
    - 2.6.2 Вирусы со спиральным типом симметрии
    - 2.6.3 Взаимное расположение нуклеиновой кислоты и капсомеров
  - 2.7 Вирусные липопротеидные оболочки
  - 2.8 Структура фагов
3. Классификация вирусов
  - 3.1 Номенклатура вирусов
  - 3.2 Критерии систематики вирусов
  - 3.3. Краткая характеристика основных структур и свойств ДНК-вирусов
  - 3.4 Семейства, роды и виды РНК-вирусов
  - 3.5 Краткая характеристика основных структур и свойств классифицированных семейств РНК-вирусов
  - 3.6 Порядки
4. Репродукция вирусов
  - 4.1 Общее представление о репродукции вирусов
  - 4.2 Первая фаза репродукции
    - 4.2.1 Адсорбция вирионов на поверхности клетки
    - 4.2.2 Проникновение вирусов в клетку
    - 4.2.3 Раздевание вируса в клетке
  - 4.3 Вторая фаза репродукции
    - 4.3.1 Транскрипция
    - 4.3.2 Трансляция информационных РНК
    - 4.3.3 Репликация генома вирусов
    - 4.3.4 Синтез вирусных белков
    - 4.3.5 Сборка вирионов
    - 4.3.6 Выход вируса из клетки
5. Взаимодействие вируса с клеткой
  - 5.1 Типы взаимодействия вируса с клеткой
  - 5.2 Реакция клетки на вирусную инфекцию
  - 5.3 Влияние вирусов на хромосомный аппарат клетки
6. Генетика вирусов
  - 6.1 Структурная организация генома клетки
  - 6.2 Структурная организация генома вируса
  - 6.3 Наследственность у вирусов
  - 6.4 Мутации у вирусов
    - 6.4.1 Спонтанные мутации

- 6.4.2 Индуцированные мутации
- 6.5 Репарация
- 6.6 Генетические и негенетические взаимодействия вирусов
- 7. О природе происхождения вирусов. Прионы
  - 7.1 Теории происхождения вирусов
  - 7.2 Прионы
  - 7.3 Виройды
- 8. Противовирусный иммунитет
  - 8.1 Естественная видовая резистентность
  - 8.2 Неспецифические клеточные и общефизиологические реакции в противовирусном иммунитете
  - 8.3 Роль фагоцитоза в противовирусном иммунитете
  - 8.4 Интерферон
- Приложение А
- 9. Библиографический список

# 1. НАУКА ВИРУСОЛОГИЯ

## 1.1 Развитие учения о вирусах

Как и всякая другая наука, вирусология развивалась путем постепенного накопления фактов. Самостоятельность и перспективы она обрела лишь в последние 70 лет.

Заболевания растений, животных и человека, вирусная природа которых в настоящее время установлена, в течение многих столетий нанесли ущерб хозяйству и вред здоровью человека. Хотя многие из этих болезней были опасны, но попытки установить их причину и обнаружить возбудителя оставались безуспешными. Такое вирусное заболевание растений, как скручивание листьев картофеля, известно несколько столетий, а пестролепестные тюльпаны, пестрая окраска которых вызвана вирусом, выращивали еще в XVI в.

В 1892 г. Д.И.Ивановский сообщил о возможности передачи мозаичной болезни табака соком, профильтрованным через бактериальные фильтры. Его сообщение осталось незамеченным; даже сам автор полностью не осознал значения своего открытия.

Впервые были представлены данные о возбудителе табачной мозаики, которые длительное время являлись критериями для отнесения возбудителей болезней к "вирусам": фильтруемость через "бактериальные" фильтры, неспособность расти на искусственных средах, воспроизведения картины заболевания фильтратом, освобожденным от бактерий и грибов. Возбудитель мозаичной болезни называется Д. И. Ивановским то «фильтрующимися бактериями, то микроорганизмами», и это понятно, так как сформулировать сразу существование особого мира вирусов было весьма трудно. М.В. Beijerinck, которому многие зарубежные ученые приписывали честь открывателя вирусов, признал в 1889 году приоритет Д.И. Ивановского. В связи с завершением своей магистерской диссертацией "Исследования спиртового брожения". Совет Петербургского университета в 1895 году утвердил Д.И. Ивановского в степени магистра ботаники.

Своими исследованиями он заложил основы ряда научных направлений вирусологии: изучение природы вирусов, цитопатология вирусных инфекций, фильтрующихся форм микроорганизмов, хронического и латентного вирусоносительства.

Наряду с работами Ивановского по вирусологии, принесшими ему мировую известность, он проводил и другие исследования. Его перу принадлежит 180 публикаций, в том числе ряд работ в области почвенной микробиологии, физиологии и анатомии растений, 30 статей в энциклопедическом словаре Брокгауза и Эфрона и двухтомный учебник по физиологии растений. Успехи, достигнутые в конце XIX в. в изучении бактериальных возбудителей болезней человека, усилили интерес к тем инфекционным болезням, возбудители которых были неизвестны.

Болезни же, о которых мы в настоящее время знаем, что они вызываются вирусами, были известны в течение тысячелетий. Эпидемия, описанная в X в. до н. э. в Китае, напоминает оспу. Желтая лихорадка, веками господствовавшая в тропической Африке и являвшаяся бедствием судовых команд африканских торговых кораблей, послужила, по видимому, основой легенд о «Летучем голландце» и других кораблях, над которыми тяготело проклятье.

Контагиозность вируса оспы была известна в течение столетий; в конце XVIII в. в медицинскую практику Запада была введена прививка: Дженнера — вакцинация экстрактами, содержащими вирус коровьей оспы. Тысячелетия назад, когда люди не имели понятия о вирусах, страшные болезни, вызванные ими заставляли искать пути избавления от них. Еще 3500 лет назад в Древнем Китае было подмечено, что люди, перенесшие легкую форму оспы, в дальнейшем никогда больше ею не заболели. Опасаясь тяжелой формы этой болезни, которая не только несла с собой неминуемое обезображивание лица, но нередко и смерть, древние решили искусственно заражать детей легкой формой оспы.

На маленьких детей надевали рубашки больных людей, у которых оспа протекла в легкой форме; в нос вдвухали измельченные и подсушенные корочки оспенных больных; наконец, оспу ”покупали”- ребенка вели к больному с крепко зажатой в руке монеткой, взамен ребенок получал несколько корочек с оспенных пустул, которые по дороге домой должен был крепко сжимать в той же руке. Этот метод предупреждения, известный под названием вариоляция, не получил широкого распространения. Сохранялась большая опасность заболевания тяжелой формой оспы, и смертность среди привитых достигала 10%. При прививках было очень трудно дозировать заразный материал от больного, и иногда такие прививки приводили к развитию очагов оспы.

Проблема предохранения от оспы была решена только в конце 18 века английским врачом Эдвардом Дженнером. Он установил, что некоторые доярки никогда не болеют оспой, а, именно, те из них, которые предварительно перенесли легкое заболевание - коровью оспу, или, как ее называли, вакцину (от греческого *vacca*, что означает “корова”).

Будучи глубоко убежденным в правильности своих выводов Э. Дженнер в 1796 году провел публичный эксперимент по прививке содержимого пустулы с руки доярки на кожу плеча 8-летнего мальчика Джемса Фиппса. На месте прививки развилось лишь несколько пузырьков. Через полтора месяца Дженнер ввел Фиппсу гнойное содержимое кожного пузырька от больного натуральной оспы. Мальчик не заболел.

Так в 1798 году была впервые доказана возможность надежного предупреждения оспы, а с 1840 года вакцину для прививок начали получать заражением телят.

Вакцина против оспы оказалась первой противовирусной вакциной, хотя вирус натуральной оспы был открыт 57 лет спустя.

В 1884 г. Пастер приготовил вакцину против бешенства из аттенуированного штамма вируса. В 1898—1899 гг. Лефлеру и Фрошу удалось передать ящур.

Скоро, однако, стало очевидным, что инфекционные агенты существуют в форме дискретных вирусных частиц. Под микроскопом они имели вид элементарных телец и статистический анализ показал, что инфекция может быть вызвана одной-единственной вирусной частицей. Задолго до того, как были достигнуты успехи в химическом изучении вирусов, цитологические исследования позволили обнаружить в инфицированных вирусами тканях специфически измененные и определенным образом локализованные участки, получившие название внутриклеточных включений. Изучение морфологии и цитохимии этих внутриклеточных включений помогало не только идентифицировать определенные вирусные инфекции, но и дало также возможность составить некоторое представление о путях биосинтеза вирусов.

Первая половина прошлого столетия была посвящена пристальному изучению вирусов - возбудителей острых лихорадочных заболеваний, разработке методов борьбы с этими заболеваниями и методов их предупреждения.

Открытия вирусов сыпались как из рога изобилия: в 1892 году был открыт вирус табачной мозаики - год рождения вирусологии как науки; 1898 году - открыт вирус ящура, 1901 году - вирус желтой лихорадки, 1907 году - вирус натуральной оспы, 1909 году - вирус полиомиелита, 1911 году - вирус саркомы Рауса, 1912 году - вирус герпеса, 1926 году - вирус везикулярного стоматита, 1931 году - вирус гриппа свиней и вирус западного энцефаломиелита лошадей, 1933 году - вирус гриппа человека и вирус восточного энцефаломиелита лошадей, 1934 году - вирус японского энцефалита и вирус паротита, 1936 году - вирус рака молочных желез мышей, 1937 году - вирус клещевого энцефалита, 1945 году - вирус крымской геморрагической лихорадки, 1948 году - вирусы Коксаки, 1951 году - вирусы лейкоза мышей и вирусы ЕСНО, 1953 году - аденовирусы и вирус бородавок человека, 1954 году - вирус краснухи и вирус кори, 1956 году - вирусы парагриппа, вирус цитомегалии и респираторно-синцитиальный вирус, 1957 году - полиомы, 1959 году - вирус аргентинской геморрагической лихорадки, 1960 году - риновирусы.

Этот почти непрерывный список открытий будет выглядеть еще внушительнее, если к 500 вирусам человека и животных добавить не меньший (если не больший!) список уже открытых к тому времени вирусов растений (более 300), насекомых и бактерий. Поэтому первая половина нашего столетия поистине оказалась эрой великих вирусологических открытий. Стремление ученых как можно скорее обнаружить и выделить вирус при

любом неизвестном и особо тяжелом заболевании вполне понятно и оправдано, так как первый шаг в борьбе с болезнью - это выяснение ее причины. И вирусы-эти страшные убийцы - оказали, в конце концов, человечеству неоценимую услугу в деле борьбы с началом с вирусами, а затем и с другими (например, бактериальными) инфекционными заболеваниями.

Выше упомянутые и многие другие вирусы прочно вошли в учебники и руководства как возбудители острых лихорадочных заболеваний. Достаточно, например, вспомнить вирус гриппа с его мировыми гигантскими эпидемиями; вирус кори ассоциирует с картиной тяжело больного ребенка, вирус полиомиелита - тяжелое заболевание детей, инвалидность, прикованность к коляскам несчастных. Несколько подробнее остановимся на вирусе гриппа, который вызывает мировые пандемии гриппа. Есть противогриппозная вакцина. Ее применение примерно вдвое снижает заболеваемость привитых, но: во-первых, заболеваемость гриппом превосходит заболеваемость всеми известными инфекционными болезнями, вместе взятыми, а во-вторых, вирус гриппа часто меняет свои свойства, и это заставляет вместо приготовленной заранее вакцины готовить в срочном порядке новую. Все эти причины объясняют высокую заболеваемость гриппом. Во время последней пандемии 1972 - 1973 годах во всем мире гриппом переболело не менее 2,5 миллиардов человек. Среди всех известных вирусов человека и животных самую многочисленную группу представляют те из них, которые переносятся членистоногими - комарами, москитами, клещами. Эта группа получила специальное название - "арбовирусы", что означает "вирусы, переносимые членистоногими". Основными хранителями различных арбовирусов могут быть ящерицы, змеи, ежи, кроты, полевки, мыши, белки, зайцы, еноты, лисы, овцы, козы, олени, свиньи и птицы. Особую роль в сохранении арбовирусов играют те животные, у которых инфекция протекает в латентной форме.

Таким образом, латентная форма инфекции необходима для сохранения вируса в природе как вида.

Потребность в удобных экспериментальных моделях организма - хозяина, с помощью которых можно было бы изучать патологию вирусных инфекций, стимулировала культивирование клеток *in vitro*. Исследования, проведенные на культурах тканей, показали, что репродукция вирусов возможна только в живых клетках; в мертвых клетках вирусы не размножаются. Серологическими методами была обнаружена антигенная специфичность вирусных белков, что послужило основой для диагностики, терапии и профилактики вирусных болезней.

Открытие в 1911 г. Раусом вируса, который вызывал злокачественные опухоли у кур. Некоторые обобщения результатов изучения целой группы злокачественных опухо-

лей у птиц послужили основанием к признанию вирусов одним из основных агентов, индуцирующих опухолевые трансформации как у животных, так и у растений.

В 1967 году в Марбурге и Франкфурте-на-Майне, а также в Белграде неожиданно вспыхнуло заболевание, среди сотрудников научно-исследовательских институтов, занимавшихся приготовлением и изучением клеточных культур из органов африканских зеленых мартышек, привезенных из Уганды. Семь человек погибло от этой неизвестной болезни.

Два года спустя в Нигерии (местечко Ласса) от неизвестного инфекционного заболевания погибает медицинская сестра. Ухаживавшие за ней две другие медсестры тоже заболели, одна из них умерла. Погиб врач, вскрывавший трупы умерших медсестер. В 1970 году во время вспышки этого заболевания в Нигерии смертность достигла 52%. Позднее были описаны вспышки болезни в Либерии и Сьерра-Лионе. За все время из 20 заболевших медработников 9 погибло.

Первое из описанных заболеваний известно теперь под названием “ вирусная болезнь Марбурга”, второе- “лихорадка Ласса”.

Открытие бактериофагов, или вирусов бактерий, Туортом явилось основным стимулом к единению вирусологии и превращению ее в самостоятельную науку.

Когда стали доступны современные физические и химические методы исследования, с помощью электронного микроскопа удалось выявить детали структуры вирионов даже самых мелких вирусов. С помощью же рентгеноструктурного анализа удалось вскрыть детали внутренней организации некоторых вирусных частиц еще до того, как это было сделано посредством электронного микроскопа. Выделение в чистом виде сначала вируса табачной мозаики, а затем и некоторых других вирусов привело к их успешной кристаллизации и дало возможность изучить их химические свойства.

Определяющая роль нуклеиновой кислоты в вирусной инфекции была доказана на примере фаговой инфекции, которая, как было обнаружено, начинается с освобождения нуклеиновой кислоты из вириона и проникновения ее внутрь бактерии-хозяина. Способность очищенной вирусной нуклеиновой кислоты вызывать инфекцию впервые была показана на примере РНК вируса табачной мозаики, а затем на РНК и ДНК многих других вирусов, включая бактериофаги, а также вирусы растений и животных.

Образование вирусных частиц можно рассматривать как кульминационный момент в морфогенетическом процессе, детерминированном вирусом. Геном вируса представлен нуклеиновой кислотой. Эта нуклеиновая кислота реплицируется и вынуждает клетку синтезировать особый (вирусоспецифичный) белок, из которого строится белковая оболочка вируса, или капсид. Полностью сформированная вирусная частица, состоящая из нуклеи-

новой кислоты, капсида, а иногда также и иных, внешних оболочек, составляет вирион.

С эпидемиологической точки зрения важным достижением явилось выявление роли насекомых-переносчиков в передаче многих вирусов животных и растений изучение комплексов хозяин-переносчик-вирус, показавшее роль латентных инфекций в сохранении патогенных вирусов в природе. Анализ спонтанного мутирования вирусов способствовал пониманию эпидемиологии вирусных болезней; этот анализ выявил, что вирусы представляют собой автономно эволюционирующие генетические системы.

## **1.2 Вирусология как биологическая наука**

Вирусология по праву стала теперь одной из основных биологических наук. Подобно тому, как в начале нашего века из некоторой важной, но чисто практической области возникла микробиология как одна из отраслей биологии, так и в середине прошлого века вирусология превратилась в определенную совокупность знаний и концепции со своими собственными перспективами и путями развития. Возникнув вначале как ветвь патологии — патологии человека и животных, с одной стороны, и фитопатологии — с другой,— вирусология достигла того уровня, когда ее прогресс определяется логикой внутреннего развития в той же мере, как и требованиями практики.

Основным стимулом к становлению вирусологии явилось накопление знаний о вирусах бактерий, или бактериофагах, и объединение изучения бактериофагов с генетикой бактерий. Вирусологи, занимающиеся изучением вирусов животных и растений, при решении различных вирусологических проблем пытались использовать методы работы с фагами и концепции, возникшие при исследовании этих объектов. Это способствовало облегчению контактов между вирусологами, которые стали более плодотворными, доказательством чему служит преуспевание журнала «Virology», основанного в 1955 г.

В это же время возникла новая отрасль биологии — молекулярная биология, изучающая свойства, функции и организацию биологических макромолекул. Вирусология стала составной частью молекулярной биологии, поскольку она изучает субклеточные объекты - вирусы, структура и организация которых лежат на макромолекулярном уровне.

Что представляет собой вирусология сегодня? Основные биологические науки можно классифицировать в соответствии с природой изучаемого ими предмета как описательные, интегративные и редукционистские науки. Описательные науки, такие, например, как ботаника, микология, энтомология, ихтиология, характеризуются тем, что изучаемый ими предмет представляет собой группу организмов, образующих определенную таксономическую единицу, т. е. имеющих общее происхождение и историческое развитие. Интегративные науки — физиология, экология, генетика — анализируют общие или специализированные свойства живых организмов в их динамических связях и превращениях.

Редукционистские науки, как, например, биохимия и биофизика, изучают элементарные процессы и функции организмов на уровне молекул, атомов, электронов, представляющих собой мельчайшие единицы материи.

Отнести вирусологию к одному из трех приведенных выше подразделений, на которые можно классифицировать биологические науки, непросто. Чтобы определить предмет, который изучает вирусология, т. е. вирусы, нельзя пользоваться теми обычными критериями, которые мы применяем для определения животных или растений. Само по себе определение вируса несколько произвольно, и было предложено много вариантов, что доказывает сложность задачи.

Львов предложил определять вирусы как «строго внутриклеточные, потенциально патогенные агенты, обладающие инфекционной фазой, содержащие лишь один тип нуклеиновой кислоты, репродуцирующиеся в форме генетического материала, неспособные к росту и делению и лишённые системы Липмана» (т. е. одной из ферментных систем, участвующих в производстве энергии). Это определение, подчеркивает неклеточную природу вирусов, их зависимость от метаболизма клетки-хозяина и тот факт, что на определенной стадии цикла репродукции специфический материал вируса представлен одной только нуклеиновой кислотой.

Согласно другому определению, вирусы рассматриваются как «элементы генетического материала, которые могут детерминировать в клетках, где они репродуцируются, биосинтез специфического аппарата, обеспечивающего их проникновение в другие клетки». Это определение подчеркивает в большей степени способность вирусов распространяться из клетки в клетку, нежели отсутствие у них собственной метаболической активности.

В настоящее время наиболее приемлемым является следующее определение: «Вирусы — это объекты, геном которых представлен нуклеиновой кислотой — ДНК или РНК; эта нуклеиновая кислота репродуцируется в живых клетках и, используя их синтетический аппарат, заставляет клетки синтезировать специализированные частицы, или вирионы, содержащие геном вируса и способные передавать его в другие клетки». Все эти определения отражают два качества вирусов: во-первых, наличие у вируса собственного генетического материала, который внутри клетки-хозяина ведет себя как часть данной клетки, и, во-вторых, существование внеклеточной инфекционной фазы, представленной специализированными частицами, или вирионами, которые репродуцируются в клетке под генетическим контролем данного вируса и служат для введения генома вируса в другие клетки. Предложенные определения отличаются друг от друга тем, какое место в них отводится другим свойствам вирусов, таким, например, как субмикроскопические разме-

ры вирусных частиц, (подразумевая под субмикроскопическими размерами размеры менее 2000 А, что находится на пределе разрешения обычного светового микроскопа) или патогенность— свойство вируса, без которого невозможно установить его присутствие в клетке - хозяина. Патогенность вирусов может быть либо явной, когда инфицированные клетки и организмы изменяются или разрушаются, либо скрытой, когда клетки сосуществуют с геномом вируса на протяжении многих поколений без заметного фенотипического проявления. Все же вирус должен, в конце концов, вызвать изменение в синтетических процессах клетки, результатом которого будет образование инфекционных вирусных частиц, или вирионов.

Внутриклеточный паразитизм свойствен не только вирусам, но и другим классам паразитов, в том числе некоторым бактериям, грибам и простейшим. Однако в определениях вирусов подчеркивается особая природа их паразитизма, который можно назвать паразитизмом на генетическом уровне. Такие паразиты, как малярийный плазмодий, бациллы проказы, риккетсии, имеют клеточную организацию — хромосомные гены, рибосомный аппарат и митохондриальный аппарат или эквивалент последнего с более или менее сложными системами для освобождения и утилизации энергии. Очевидно, что эти паразиты являются клеточными организмами независимо от того, устроены ли они по принципу эукариотических клеток, т. е. клеток животных и растений, для которых характерно наличие набора хромосом и полностью развитой системы внутриклеточных мембран, либо по принципу прокариотических клеток, подобных бактериальным. Тот факт, что эти организмы способны выживать и размножаться только внутри других клеток, объясняется не отсутствием собственной клеточной организации, а их потребностью в поступлении «готовых» (экзогенных) источников питания.

Долгое время к вирусам относили группу внутриклеточных патогенных агентов, таких, например, как возбудители пситтакоза, венерической лимфогранулемы и других сходных болезней. В настоящее время эти возбудители классифицируются как *Chlamydozoaceae*, а по самой последней классификации как род *Miyagawanella* (в составе класса риккетсий). К вирусам их нельзя относить по двум причинам: они содержат два типа нуклеиновой кислоты, что предполагает наличие у них клеточной организации, и они сохраняют эту организацию внутри клетки, где они растут, т. е. увеличиваются в размерах и размножаются делением надвое.

Репликация вирусов находится в строгой зависимости от клетки-хозяина. Этим они отличаются от субмикроскопических, но свободно живущих организмов, таких, как *Mycoplasma*, которые обладают клеточной организацией и, являясь бактериями, лишены жесткой клеточной стенки. Зависимость *Mycoplasma* практически от всех метаболитов,

которые могут проникать через полупроницаемую мембрану, привела к крайнему сокращению их генома, ферментного аппарата, клеточных структур и соответствующему уменьшению их размеров. Образование так называемых L-форм, которые представляют собой обычные бактерии, утратившие в результате мутаций способность образовывать клеточную стенку, возможно, следует рассматривать как модель того процесса, который привел к появлению *Mycoplasma*.

Специфичность круга хозяев у вирусов является дополнительным доказательством того, что отношение вирус — хозяин не ограничивается лишь питанием, а носит более сложный характер. Если бы нашелся такой внутриклеточный паразит, который, будучи неспособен размножаться в свободном состоянии, тем не менее, мог бы размножаться в живых клетках любого типа, то мы вправе были бы допустить, что этот паразит будет размножаться и в свободном состоянии, если только он получит какие-то пока еще не известные нам (возможно, нестойкие) вещества, которые обычно ему поставляет клетка. Позднее мы увидим, однако, что взаимоотношения вирусов с клеткой-хозяином очень сложны; ожидать, что вирус будет размножаться в свободном состоянии, можно только в том случае, если нам удастся выделить из клетки и реконструировать *in vitro* клеточный аппарат, необходимый для того, чтобы макромолекулярные синтезы протекали упорядоченным образом.

Размеры частиц — вопрос, который мы будем детально обсуждать ниже, — являются недостаточным критерием для отнесения исследуемых частиц к категории вирусов. Это становится очевидным, если мы сопоставим эти размеры, с одной стороны, с мельчайшими клетками *Mycoplasma* (диаметр — 100 мкм, т. е. меньше, чем у самых больших вирусов) и, с другой, например, с молекулами гемоцианина (молекулярный вес 3- 106 дальтон — величина, сравнимая с массой достаточно мелкого бактериофага).

Возможно, в растительных и животных клетках могли бы образовываться вирусные частицы диаметром в несколько микронов. Но именно малые размеры вирусов сыграли в свое время важную роль в создании соответствующих вирусологических методов. С самого зарождения вирусологии для отделения инфекционных вирусных частиц от бактерий (загрязняющих препарат вируса) и для доказательства небактериальной природы изучаемых заболеваний использовались бактериальные фильтры. Отсюда и традиционное название фильтрующийся вирус, заменившее прежнее ультравирус, а затем в свою очередь замененное общепринятым в настоящее время словом вирус.

### **1.3 Связь вирусологии с другими биологическими науками**

Связь вирусологии с бактериологией основывается как на общности методов (мик-

роскопия, фильтрация, стерилизация), так и на общности объекта (и бактерии и вирусы принадлежат к группе патогенных микробов).

Изучение вирусов тесно связано с изучением обусловленных ими патологических изменений в организме хозяина, ибо выявление, идентификация и титрование вирусов зависят почти исключительно от наблюдений аномальных изменений, вызываемых шли в некоем организме. Следовательно, вирусология тесно связана с патологией человека, животных и растений. Однако в первую очередь эта наука должна изучать свойства и функции вирусов, чтобы в конечном счете оказалось возможным интерпретировать прямо или косвенно все обусловленные вирусами патологические изменения в организме хозяина в концепциях механизмов, посредством которых вирусы взаимодействуют с его клетками.

Вирусология тесно связана с химией белков и физической химией и заимствует применяемые в этих областях методы исследования, поскольку небольшие размеры вирусных частиц в какой-то степени совпадают с размерами макромолекул белков и нуклеиновых кислот. Методы очистки и определения размеров, однородности и плотности частиц сходны в отношении вирусов и белков. Однако эта связь между вирусологией и макромолекулярной химией благодаря сходству применяемых в этих областях методов исследования не должна затемнять то различие, которое существует между вирусами и различными классами макромолекул — белками и нуклеиновыми кислотами, являющимися компонентами как всех клеток, так и вирусных частиц.

#### **1.4 Природа вирусов**

Вопрос о природе вирусов — один из наиболее неясных вопросов вирусологии. Является ли вирус организмом? Можно ли считать его живым? Когда было найдено, что вирионы некоторых вирусов после выделения их из экстрактов инфицированных клеток и соответствующей очистки имеют почти одинаковые размеры, форму, химический состав и даже могут кристаллизоваться, возникла необходимость примирения «молекулярной» природы этих частиц с их способностью репродуцироваться. Как обычно в таких случаях, трудности носили скорее семантический характер. Такие слова, как «организм» и «живой», однозначны только в применении к тем объектам, в отношении которых они были первоначально введены. Так, лягушка — это организм; собака, которая бегаёт и лает, несомненно живая. Но почему, собственно, лягушка — это организм?

Согласно Львову, организм — это некая независимая единица интегрированных и взаимосвязанных структур и функций. Лягушка представляет собой такую единицу; отдельные же клетки ее тела (хотя каждую из них тоже можно рассматривать как некую единицу интегрированных и взаимосвязанных структур и функций) не являются независимыми в обычном смысле слова. (Отметим, что и сама лягушка не во всех отношениях

подходит под определение «независимой единицы», хотя бы, например, из-за существования двух разных полов.) У простейших, т. е. у одноклеточных форм, именно клетка является независимой единицей, иными словами, организмом. Клеточные органеллы — митохондрии, хромосомы, хлоропласта — это не организмы, ибо они не являются независимыми.

Таким образом, если придерживаться определения Львова, то вирус нельзя назвать организмом, поскольку он не обладает независимостью. Инфекционная вирусная частица полностью зависит от живой клетки-хозяина; вне этой клетки невозможны ни размножение вируса, ни реализация его генетических потенций. В этом отношении вирусы в такой же степени зависят от клетки-хозяина, как и ее собственные гены, выражение которых осуществимо также при условии целостности клетки. Ген и хромосома не являются организмами (это следует из наших рассуждений), следовательно, и вирус не организм.

Мы можем рассмотреть и другое определение организма, которое подчеркивает не столько функциональную независимость, сколько индивидуальность, историческую непрерывность и эволюционную независимость. Клеточный ген или генный комплекс имеет индивидуальность и историческую непрерывность, но его эволюция ограничена пределами одной линии клеток; следовательно, он не организм. У многоклеточных видов независимо от того, представляют ли они собой виды животных или растений, отдельные линии клеток не могут эволюционировать независимо друг от друга; следовательно, их клетки не являются организмами.

Для того чтобы изменение было эволюционно значимым, оно должно быть передано новому поколению особей, В соответствии с этим рассуждением организм представляет собой элементарную единицу некоторого непрерывного ряда со своей индивидуальной эволюционной историей.

Вирус обретает относительно независимую эволюционную историю благодаря свойственной ему способности передаваться от хозяина к хозяину. Он может пережить клетку и организм, в которых паразитирует. Круг хозяев вируса в ряде случаев не ограничивается лишь каким-либо одним видом организмов. Один и тот же вирус может встречаться и у представителей разных видов, родов и даже типов. Он может передаваться от растения насекомым и размножаться в клетках тех и других. Вирус может, обладая соответствующей приспособляемостью, испробовать предоставляемые ему очень далекие друг от друга ниши. Таким образом, вирус обладает, конечно, большей независимостью, чем любая клеточная органелла; он в большей степени организм с эволюционной точки зрения, чем хромосома или даже клетка многоклеточного животного, хотя функционально значительно менее независим, чем любая такая клетка.

Подобный же ход рассуждений может помочь нам выйти из того затруднительного положения, в котором мы находимся, обсуждая вопрос о том, куда относить вирусы: к царству живого или к царству неживого, Львов определяет жизнь как «свойство, проявление или состояние клеток и организмов, охарактеризованных как независимые структурные и функциональные единицы. Поэтому он рассматривает вирусы как неживые, ибо не считает их организмами. В первом издании этой книги отправной точкой дискуссии о природе вирусов было подобного же типа утверждение, а именно: «жизнь представляет собой свойство некоей организованной части материи, т. е. свойство организмов», однако и в этой, дискуссии подчеркивалась репродуктивная и эволюционная непрерывность и независимость вирусов. Было выдвинуто следующее операциональное определение: «Живым мы называем то, что, будучи изолировано, сохраняет свою специфическую конфигурацию, так что эта конфигурация может быть реинтегрирована, т. е. вновь включена в цикл, в котором участвует генетическое вещество».

Это отождествляет жизнь с наличием независимого, специфического, самореплицирующегося способа организации. Белок с этой точки зрения «неживой, ибо аминокислотная последовательность, как таковая, никогда не копируется в клетке. Специфическая же последовательность оснований нуклеиновой кислоты того или иного гена может копироваться: ген — это некая часть запаса информации, которым располагает живой организм.

Следует ли в таком случае считать нуклеиновую кислоту живой? Упомянутое выше определение предлагает в качестве теста на живое экстракцию и воспроизведение в различных клеточных линиях и в ряде поколений организмов. Вирус, согласно этому тесту, живой, точно так же как и любой другой фрагмент генетического материала, о котором мы знаем, что его можно извлечь из клетки, вновь ввести в живую клетку и что при этом он будет копироваться в ней и станет хотя бы на некоторое время частью ее наследственного аппарата.

Фрагменты ДНК различных видов бактерий (принадлежащих к родам *Pneumococcus*, *Streptococcus*, *Neomophilus*, *Bacillus* и некоторым другим) способны к такой реинтеграции при введении в живые клетки соответствующего вида. Это так называемый феномен «трансформации». Следовательно, мы должны сказать, что любой фрагмент ДНК этих бактерий обладает признаками живого.

Существует, однако, важное различие в способности к передаче бактериальной ДНК и ДНК вирусного генома. Передача фрагментов ДНК бактерий, хотя она и имеет место в природе, является, по-видимому, случайным событием, не имеющим важного эволюционного значения, тогда как передача генома вируса составляет основной смысл су-

ществования этих форм — результат их селективной специализации.

Как мы увидим далее, нуклеиновая кислота некоторых вирусов, выделенная из вирусных частиц или из инфицированных клеток, может проникать в другие клетки и реплицироваться в них. Однако в большинстве случаев эффективность инфекции при этом заметно снижается по сравнению с инфекцией, вызванной целыми вирусными частицами. Иными словами, перенос генетического материала в форме целых вирусных частиц осуществляется более эффективно, чем в форме одной только-нуклеиновой кислоты вируса. Это дает возможность считать вирусы «более живыми», чем какие-либо другие фрагменты генетического материала, и «более организмами», чем любые клеточные органеллы, включая хромосомы и гены.

### **1.5 Основные группы вирусов**

Стало уже обычным подразделять вирусы в соответствии с природой их хозяев на вирусы растений, вирусы животных и вирусы бактерий, или бактериофаги. Но даже такое общее подразделение не свободно от противоречий. Вирусы растений, например, могут размножаться в насекомых-переносчиках. Поскольку вирусы были открыты как патогенные агенты, т. е. агенты, вызывающие появление каких-то аномальных признаков у некоторых хозяев, логично подразделять их по принципу «основного хозяина», т. е. хозяина, у которого такие аномалии впервые были обнаружены человеком. Каждый вирус имеет какой-то «набор» хозяев — более или менее родственных организмов, в которых он может репродуцироваться. Для сохранения вирусов в природе часто более важны те хозяева, в которых вирусы вызывают наименьшие изменения, а не основные хозяева, представляющие интерес для человека.

## **2. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФИЗИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВИРУСОВ**

Вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты животных, растений, насекомых, бактерий, грибов, простейших и других живых существ. Это неклеточные формы жизни, обладающие собственным геномом и способные к воспроизведению лишь в клетках более высокоорганизованных существ. Они имеют две формы жизни: внеклеточную, или покоящуюся, и внутриклеточную, размножающуюся (репродуцирующуюся), или вегетативную. Синонимами внеклеточной формы являются: «вирусная частица», «вирусный корпускул», «вирион», синонимом внутриклеточной формы — «комплекс вирус — клетка».

Единица массы. Масса вирионов и их компонентов — нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов — измеряется в дальтонах (Д). Для удобства используются производные от дальтона единицы — килодальтон (кД), мега-дальтон (МД), миллидальтон (мД): 1

$D=1,67 \times 10^{-24}$  г; 1 кД=1000 Д; 1 МД=1000 кД= $10^6$  Д, 1 мД= $10^{-3}$  Д.

Мол. масса нуклеиновых кислот большинства вирусов, имеющих односпиральную РНК, лежит в пределах 2—4 МД, у вирусов, имеющих двуспиральную РНК, она достигает 15 МД. Мол. масса нуклеиновых кислот ДНК-содержащих вирусов колеблется в более широких пределах — от 1,5—2 МД у парвовирусов до 160—180 МД у поксовирусов.

Единица длины. Вирусы из-за небольшого размера обычно измерялись в миллимикронах (ммк), но принятая Международная система единиц (СИ) ввела альтернативные методы измерения. По этой системе микрон теперь называется микрометром (мкм), миллимикрон — нанометром (нм). Некоторые ученые для измерения очень маленьких структур, таких, как капсомеры вируса, используют в качестве единицы измерения ангстрем (А, или АИ). Отношения между этими единицами длины следующие: 1 мкм= $10^{-6}$  м; 1 нм= $10^{-9}$  м; 1 мм=1000 микрометрам (мкм); 1 мкм=1000 нанометрам (нм); 1 нм=10 ангстремам (А, или АИ).

## 2.1 Химический состав вирусов

Вирионы просто организованных вирусов представляют собой вирусную нуклеиновую кислоту, заключенную в оболочку (капсид) из повторяющихся субъединиц (капсомеров). Каждый капсомер построен из одного или нескольких белков, закодированных в геноме вируса. Кроме нуклеиновой кислоты и белков они содержат липиды и гликолипиды, которые обычно располагаются в наружной (суперкапсидной) оболочке вирионов. В состав последних часто входят гликопротеиды (гликозилированные белки, к полипептидным цепям которых ковалентно присоединены углеводные цепи), липопротеиды, чаще всего ацилированные белки (белки, к полипептидным цепям которых ковалентно присоединены остатки жирных кислот) и фосфопротеиды (белки, к полипептидным цепям которых ковалентно присоединены остатки фосфорной кислоты). Обычно липиды и гликолипиды клеточного происхождения, за исключением, возможно, поксвирусов. Липиды не всегда расположены в наружной оболочке вириона.

Углеводы, входящие в состав вирусных белков, представляют собой полимерные цепи, синтезируемые из мономерных звеньев, поставляемых клеткой причем, у поксвирусов структура олигосахаридных цепей зависит от структуры белка, к которому они присоединены.

Присоединение к вирусным белкам остатков фосфорной и жирных кислот и углеводных цепей осуществляется, как правило, клеточными ферментами, но специфичность присоединения зависит от структуры белка.

1. Нуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры, со-

стоящие из нуклеотидов.

2. Нуклеотиды состоят из трех частей: остатка фосфорной кислоты, углеводного остатка (дезоксирибозы для ДНК, рибозы для РНК) и азотистого основания.

3. В состав ДНК обычно входят азотистые основания тимин, аденин, гуанин и цитозин.

4. В состав РНК обычно входят уридин, аденин, гуанин, цитозин.

Разнообразие структуры нуклеиновых кислот обусловлено различным порядком чередования в их цепях нуклеотидов.

5. ДНК представляет собой двунитчатую молекулу, РНК — однонитчатую.

6. Двуспиральная ДНК — это клеточный геном, выполняющий функции хранения и репликации наследственной информации. Односпиральная РНК представлена тремя классами молекул: 1) информационные РНК, (иРНК), образующиеся в результате транскрипции генома и передающие в геноме информацию на белоксинтезирующий аппарат клетки; 2) рибосомальные РНК, являющиеся структурным элементом рибосомы; 3) тРНК, доставляющие аминокислоты к белоксинтезирующему аппарату.

7. Нуклеотиды различаются по структуре углеводного остатка. Так, в состав РНК входит пятиуглеродный сахар — рибоза, а в состав ДНК — другой сахар — дезоксирибоза.

8. Нуклеотиды, а следовательно, и содержащие их нуклеиновые кислоты отличаются друг от друга еще и по строению органических оснований. Так, обычно в состав ДНК входят следующие четыре основания: аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц), а в состав РНК — аденин (А), гуанин (Г), урацил (У) и цитозин (Ц).

9. В 1950 г. американский биохимик Э. Чаргафф определил, что независимо от происхождения двуспиральных ДНК содержание в них аденина всегда равно содержанию тимина (А-Т, или  $A:T=1$ ), а гуанина — содержанию цитозина (Г-Ц, или  $G:C=1$ ). Отсюда следовало, что сумма А и Ц равна сумме Г и Т, или  $(G+T):(A+C) = 1$ . Эти соотношения получили в дальнейшем название правил Чаргаффа. Правила Чаргаффа не распространены на односпиральные ДНК. При анализе другого типа нуклеиновой кислоты — РНК (тоже различного происхождения) указанных закономерностей не наблюдалось.

10. ДНК обычно построена из двух полинуклеотидных цепочек, закру-

ченных спиралевидно одна вокруг другой. Основной углеводно-фосфатный костяк обеих цепочек ДНК расположен снаружи спирали, а органические основания — внутри нее, друг против друга. Обе цепочки ДНК удерживаются водородными связями между парами оснований А—Т и Г—Ц. Только при соединении двух бициклических молекул оснований (А и Г) с однокольцевыми (Т и Ц) может соблюдаться одинаковое расстояние между цепями. Такое пространственное соответствие пар оснований (А—Т и Г—Ц) называется комплементарностью. Благодаря комплементарному построению обе нити ДНК становятся взаимнооднозначными. Последовательность оснований в одной цепи однозначно определяет их последовательность в другой. Поэтому, зная расположение оснований в одной нити, можно построить на основании закона комплементарности вторую нить и наоборот:

Отсюда следует, что биологический «смысл» этих цепей различен: белки, если бы они синтезировались согласно генетической информации, заключенной в этих цепях ДНК, были бы различны и имели различную последовательность аминокислот. У вирусных геномов обе цепи используются для кодирования белков.

## **2.2 Вирусные нуклеиновые кислоты**

Клетки всех живых организмов содержат два вида нуклеиновой кислоты — ДНК и РНК. 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.

Вирусный геном может быть представлен как односпиральными, так и двуспиральными молекулами РНК и ДНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой

Тип ДНК

Линейная односпиральная

Кольцевая односпиральная

Линейная двуспиральная

Двуспиральная кольцевая со свехвитками или без них

Двуспиральная кольцевая с односпиральным участком

Тип РНК

Линейная односпиральная

Фрагментированная односпиральная

Фрагментированная односпиральная кольцевая

Фрагментированная двуспиральная

Линейная односпиральная, диплоидный геном

### **2.2.1 Вирусные ДНК**

Мол. масса вирусных ДНК варьирует в широких пределах от 1-106МД до 250-106МД. Самые большие вирусные геномы содержат несколько сотен генов, а самые маленькие содержат информацию, достаточную для синтеза лишь нескольких белков.

В вирусных геномах, представленных двуспиральными ДНК, информация может быть закодирована на обеих нитях ДНК. Кроме того, известно, что в вирусных геномах встречается перекрытие генов (использование части информации об одном белке для кодирования другого белка). Это свидетельствует о максимальной экономии генетического материала у вирусов, что является неотъемлемым свойством их как генетических паразитов. В связи с этим оценка объема генетической информации может быть проведена по мол. массе молекул.

Способность к приобретению кольцевой формы, которая потенциально заложена в концевых прямых и инвертированных повторах (Инвертированные повторы — участки нуклеиновых кислот с обратным построением нуклеотидных последовательностей, могущие образовывать шпильчатые структуры. Имеют важное значение в регуляции многих процессов. Пример: либо линейный АТГС, GCAT, либо шпилька), имеет большое значение для вирусов. Кольцевая форма обеспечивает устойчивость ДНК к экзонуклеазам (Экзонуклеазы — ферменты, последовательно отщепляющие нуклеотиды с концов полинуклеотидной цепи). 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 односпиральную 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- или минус-ДНК. Инфекционный процесс при заражении этими вирусами возникает лишь при проникновении в клетку частиц обоих типов.

### **2.2.2 Вирусные РНК**

Из нескольких сотен известных в настоящее время вирусов человека и животных РНК-геном содержит около 80% вирусов. Способность вирусов хранить наследственную информацию — уникальная особенность их, у некоторых РНК-геномных вирусов нуклеиновая кислота в отсутствие белка может вызывать инфекционный процесс.

Структура вирусных РНК чрезвычайно разнообразна. У вирусов обнаружены односпиральные и двуспиральные, линейные, фрагментированные и кольцевые РНК. РНК-геном обычно является гаплоидным, но геном ретровирусов — диплоидный, т. е. состоит из двух идентичных молекул РНК.

Односпиральные РНК. Молекулы односпиральных вирусных РНК существуют в форме одиночной полинуклеотидной цепи со спирализованными ДНК-подобными участками. При этом некоплементарные нуклеотиды, разделяющие комплементарные участки, могут выводиться из состава спирализованных участков в форме различных «петель» и «выступов». Суммарный процент спирализации вирусных РНК варьирует в широких пределах. Вирусы, содержащие односпиральную РНК, делятся на две группы. У вирусов первой группы вирусный геном обладает функциями информационной РНК, т. е. может непосредственно служить матрицей для синтеза белка на рибосомах. 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 односпиральной РНК, которая сама не обладает функциями иРНК. В этом случае функцию иРНК выполняет РНК, комплементарная геномной. Синтез этой РНК (транскрипция) осуществляется в зараженной клетке на матрице геномной РНК с помощью вирусспецифического фермента — транскриптазы. В составе минус-нитевых вирусов обязательно присутствие собственного фермента, 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 вызывать 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'-3'-концов этих РНК; 5'-конец клеточных и вирусных РНК обычно имеет структуру так называемой шапочки (по английски «сар»). На 5'- и 3'-концах иРНК имеются поли (А), количество которых достигает 200 и выше. Эти модификации концов иРНК, осуществляемые после синтеза полинуклеотидной цепи, имеют существенное значение для функции иРНК: «шапочка» нужна для специфического узнавания иРНК рибосомами, функции поли (А) заключаются в придании стабильности молекулам иРНК.

Таковыми же модифицированными концами обладают геномные РНК плюс-нитевых вирусов. 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 односпиральные РНК являются линейными молекулами, однако РНК-фрагменты буньявирусов обнаружены в виде кольцевой формы. Кольцевая форма возникает за счет образования водородных связей между концами молекул.

Двухспиральные 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 диплорнавирусами. Особенностью их является фрагментированное состояние генома. Так, геном реовирусов состоит из 10 фрагментов, ротавирусов — из 11 фрагментов.

### **2.3 Вирусные белки**

Белки представляют собой чрезвычайно разнородный класс биологических макромолекул. Обязательными компонентами белков являются аминокислоты.

Мол. масса аминокислот лежит в пределах 90—250 Д. В состав полипептида может входить от 15 до 2000 аминокислот, наиболее часто встречаются полипептиды с массой от 20 до 700 кД, состоящие из 100—400 аминокислот. В молекуле полипептида аминокислоты ковалентно соединены в линейный полимер пептидными связями, образующимися между  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ - группами соседних аминокислот.

Две аминокислоты, соединенные пептидной связью, называются дипептидом, три — трипептидом и т. д. несколько (5—10)—олигопептидом, более длинные полимеры — пептидами, еще более длинные — полипептидами. Белки могут состоять из одного или нескольких (обычно не более 6) полипептидов. Белки, состоящие только из аминокислотных остатков, называются простыми белками — протеинами. Белки, состоящие из аминокислот и неаминокислотной части, называются сложными белками — протеидами.

Если неаминокислотная часть представлена ионами металла, белок называется металлопротеидом, углеводными остатками — гликопротеидом, липидными молекулами — липопротеидом, остатками фосфорной кислоты фосфопротеидом, нуклеиновой кислотой — нуклеопротеидом и т. д. Практически все белки состоят из 20 аминокислот. В состав одного конкретного белка может входить от 3 до 20 аминокислот. Порядок чередования

их в полипептидной цепи и длина последней определяют первичную структуру белка. Этот первый простейший уровень организации молекул, определяющий структуру всех белков, полностью и однозначно кодируется участком нуклеиновой кислоты, содержащим информацию, необходимую для синтеза данного белка. Следующий уровень организации молекул белка — вторичная структура. Если первичная структура белка поддерживается одним видом связи — пептидной связью, то вторичная структура — тремя видами связи: дисульфидной, водородной и гидрофобной. Дисульфидная связь возникает между двумя остатками цистеина.

Дисульфидная связь может соединять различные части одной полипептидной цепи, образуя на них петли различной длины и конфигурации. Водородные связи возникают в молекуле белка между атомными группировками образующими пептидные связи. Наличие этих связей приводит к образованию в составе полипептида  $\beta$ -складчатых или  $\alpha$ -спиральных структур.



Гидрофобные связи возникают между боковыми радикалами; гидрофобных аминокислот, вызывая изгибы полипептидной цепи.

Следующий уровень организации — сверхвторичная структура белка — определяется водородными, гидрофобными и ионными связями, но взаимодействуют между собой участки полипептидной цепи, уже обладающие вторичной структурой. При этом образуются суперспирали (спираль из спиралей), суперскладчатые и глобулярные структуры, именуемые доменами.

Следующий уровень организации — третичная структура. Она поддерживается теми же видами связей, что и вторичная и сверхвторичная, но взаимодействуют между собой участки полипептидной цепи, уже обладающие этими двумя типами структур. Для многих белков третичная структура является высшим уровнем организации. У всех белков она окончательно формирует конфигурацию молекулы полипептида или белка. У ряда белков, входящих в состав сложных ферментов с регулируемым действием и самособирающихся структур, например вирусных капсидов имеется еще и четвертичная структура, обусловленная взаимодействием молекул, обладающих третичной структурой.

Вирусные (вируспецифические) - белки, кодируемые геномом вируса, — синтезируются в зараженной клетке. Исходя из функции локализации, структуры и регуляции синтеза, вирусные белки делят на структурные и неструктурные; ферменты, предшественники, гистоноподобные капсидные белки; мембранные, трансмембранные и т. д.

Структурные белки. Структурными называют все белки, входящие в состав зрелых внеклеточных вирионов. Структурные белки в вирионе выполняют ряд функций:

- 1) защита нуклеиновой кислоты от внешних повреждающих воздействий;
- 2) взаимодействие с мембраной чувствительных клеток в ходе первого этапа их заражения;
- 3) взаимодействие с вирусной нуклеиновой кислотой в ходе и после ее упаковки в капсид;
- 4) взаимодействие между собой в ходе самосборки капсида;
- 5) организация проникновения вируса в чувствительную клетку.

Эти пять функций присущи структурным белкам всех без исключения вирусов. Все функции могут реализоваться одним белком. Например, у вируса табачной мозаики есть лишь один структурный белок, состоящий из единственной полипептидной цепи с молекулярной массой 17—18 кД. У других вирусов эти функции разделены тем или иным способом между разными белками.

- 6) способность к разрушению в ходе освобождения нуклеиновой кислоты. Эта функция присуща белкам всех вирусов, кроме некоторых сателлитных вирусов, не способных к самостоятельной репродукции в отсутствие вируса-помощника;
- 7) организация выхода из зараженной клетки в ходе формирования вириона. Эту функцию выполняют структурные белки вирусов, вирионы которых выходят из зараженной клетки путем почкования;
- 8) организация «плавления» и слияния клеточных мембран. Эта функция часто именуется F-активностью (фьюжн-актив-ность, от англ. «слияние») и присуща белкам вирусов, проникающих в клетки путем слияния суперкапсидных оболочек вирионов с клеточными мембранами.

Кроме названных выше, структурные белки могут обладать свойствами катализировать те или иные биохимические реакции. Некоторые вирусологи выделяют их в особую группу, именуемую «ферменты вирионов». Обычно структурные белки вирионов обладают теми видами ферментативной активности, которые необходимы для репродукции вируса, но отсутствуют в клетке. Две из этих ферментативных активностей так важны, что их полезно выделить отдельно;

- 9) РНК-зависимая РНК-полимеразная активность. Эту функцию выполняют структурные белки всех вирусов, в вирионах которых содержится РНК, не играющая роль мРНК;

10) РНК-зависимая ДНК-полимеразная активность. Эту функцию выполняют специальные белки ретровирусов, именуемые ревертазами, или обратными транскриптазами. Кроме этих ферментов в сложно организованных вирионах, например, покс-, герпес- и иридовирусов содержатся киназы, нуклеазы, протеазы, фосфорилазы, трансферазы и др.;

11) защита и стабилизация вирусной нуклеиновой кислоты после ее выхода из капсида в зараженной клетке. Эта функция реализуется ковалентно и нековалентно связанными с нуклеиновой кислотой белками, пикорна-, папова-, адено-, орби-, покс-, свирусов.

Таков неполный перечень функций структурных вирусных белков.

В зависимости от расположения того или иного белка в вирионе выделяют группы белков:

а) капсидные белки. В вирионах сложно организованных вирусов эти белки могут выполнить только 2—3 функции — защита нуклеиновой кислоты, способность к самосборке и разрушению в ходе освобождения нуклеиновой кислоты. В вирионах простых вирусов их функции обычно более многообразны;

б) белки вирусной суперкапсидной оболочки. Имеются у вирусов, выходящих из клеток путем почкования. Их роль сводится в основном к организации почкования вирионов, способности к самосборке, взаимодействию с мембраной чувствительных клеток, организации проникновения в чувствительную клетку, т. е. к F-активности, и защите нуклеиновой кислоты. Эти белки формируют пепломеры — белковые выросты на суперкапсидной оболочке — и являются, как правило, гликопротеидами;

в) матриксные белки. Это белки промежуточного слоя вирионов, расположенного сразу под суперкапсидной оболочкой некоторых вирусов. Их основные функции: организация почкования, стабилизация структуры вириона за счет гидрофобных взаимодействий, посредничество в осуществлении связи суперкапсидных белков с капсидными;

г) белки вирусных сердцевин. Имеются у покс-, иридо-, орби-, рео-, герпесвирусов. Представлены в основном ферментами. Вирусы, имеющие многослойные капсиды, могут иметь и защитную роль;

д) белки, ассоциированные с нуклеиновой кислотой. Белки самого внутреннего слоя вирионов. Представлены у сложных вирусов гистоноподобными белками, ферментами синтеза и модификации нуклеиновых кислот (РНК-зависимые РНК- и ДНК-полимеразы, ДНК-зависимые ДНК- и РНК-полимеразы, метилазы, трансферазы и т. д.) и, наконец, кэпирующими белками, которые имеются у вирусов с инфекционной РНК,, связаны с РНК ковалентно, необходимы для осуществления ее функции в качестве иРНК.

Неструктурные белки. Неструктурные вирусные белки — это все белки, кодируе-

мые вирусным геномом, но не входящие в вирион. Они изучены гораздо хуже, чем структурные, что связано с несравненно большими трудностями, которые возникают при их идентификации и выделении по сравнению со структурными белками. Неструктурные белки в зависимости от их функций делят на пять групп:

- 1) регуляторы экспрессии вирусного генома;
- 2) предшественники вирусных белков;
- 3) нефункциональные пептиды;
- 4) ингибиторы клеточного биосинтеза и индукторы разрушения клеток;
- 5) вирусные ферменты.

Белки, входящие в первую группу, непосредственно воздействуют на вирусную нуклеиновую кислоту, препятствуя синтезу других вирусных белков или, наоборот, запуская их синтез. Кроме того, у ряда вирусов белки, входящие в эту группу, модифицируют белоксинтезирующий аппарат клетки так, что он начинает избирательно синтезировать вирусные, а не клеточные белки,

Белки, входящие во вторую группу, являются предшественниками других вирусных белков, которые образуются из них в результате сложных биохимических процессов. Сумма этих процессов называется процессингом, или постсинтетической модификацией белков. Пример с нарезанием полимерной цепочки.

В ходе процессинга образуется ряд предшественников, причем этот процесс идет не всегда однозначно; нарезание может происходить не полностью, кроме того, существует ряд точек альтернативного нарезания, в ходе которого образуются нефункциональные полипептиды. Еще сложнее протекает процессинг протеидов, состоящих из нескольких полипептидных цепей. Процессинг гемагглютинаина (НА) вируса гриппа протекает следующим образом. На рибосоме синтезируется полипептид НА (предшественник). Уже после образования короткого пептида длиной 5—10 аминокислотных остатков рибосома с растущей цепью полипептида и мРНК оказывается связанной с эндоплазматической мембраной за счет того, что среди этих аминокислотных остатков большинство гидрофобных, и они внедряются в гидрофобный слой мембраны. Трансляция мРНК продолжается с векторной разгрузкой синтезируемого полипептида во внутреннее пространство цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума, затем начинается свертывание полипептидной цепи, в результате обнажаются участки полипептида, с которых может начаться гликозилирование. К этим участкам гликозилтрансферазой ковалентно присоединяется олигосахарид, имеющий в своем составе три остатка глюкозы, девять остатков маннозы и два остатка N-ацетилглюкозамина. После этого гликопротеид транспортируется через гладкий эндоплазматический ретикулум, в котором гликопротеид попадает в

микробузырьки, образованные из его мембран. Эти микробузырьки сливаются с мембранами аппарата Гольджи. В мембранах последнего локализованы экзогликозидазы, которые отщепляют концевые углеводные остатки, и эндогликозидазы, отщепляющие короткие олигосахаридные цепочки, а также гликозилтрансферазы, достраивающие олигосахаридные цепочки. Совокупность этих процессов называется триммингом (от англ. «отделка»).

По завершении тримминга гликопротеиды транспортируются в плазмалемму посредством микробузырьков, отшнуровывающихся от мембран аппарата Гольджи. В процессе транспорта может происходить нарезание, фосфорилирование и ацилирование молекул гликопротеида. Таким образом, здесь процессинг идет по пути нарезания, гликозиллирования и тримминга одновременно, причем он тесно сопряжен с транспортом молекулы с рибосомы на плазматическую мембрану.

Белки, входящие в третью группу (нефункциональные пептиды), образуются в зараженной клетке двумя путями: первый упомянут при описании процессинга предшественников; второй заключается в том, что ряд белков синтезируется в неактивной форме, которую формально можно также назвать предшественниками. Вместе с тем в отличие от «обычных» предшественников из них в ходе процессинга образуется не несколько, а лишь один белок. Образуется он после отрезания обычно очень короткого, пептида, который блокировал активный центр белка. Эти короткие пептиды, как правило, не исполняют после отрезания какой-либо вирусспецифической функции.

К четвертой группе относятся белки, которые разрушают клеточные ДНК и мРНК, модифицируют клеточные ферменты, придавая им вирусспецифическую активность. Сюда же относятся белки непочкующихся вирусов, дестабилизирующие клеточные мембраны, вызывающие их лизис и выход сформированных вирионов во внеклеточное пространство.

К последней группе неструктурных белков относятся ферменты, кодируемые вирусным геномом, но не входящие в состав вирионов.

#### **2.4 Вирусные липиды**

Обнаружены у сложно организованных вирусов и в основном находятся в составе липопротеидной оболочки (суперкапсида), формируя ее липидой бислой, в которой вставлены суперкапсидные белки.

Все сложно организованные РНК-содержащие вирусы имеют в составе значительное количество липидов (от 15 до 35% от сухой массы). 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. В составе суперкапсидных оболочек вирусов липиды обеспечивают взаимодействие пепломеров, изолируют внутренние слои вирионов от гидрофильных веществ, содержащихся во внешней среде, участвуют в ходе процесса депротеинизации вирионов при заражении чувствительных клеток, стабилизируют структуру вирионов. Экстракция липидов органическими растворителями, обработка вирусной частицы детергентами или липазами приводят к деградации вирусной частицы и потере инфекционной активности.

Вирусы, содержащие липопротеидную мембрану, формируются путем почкования на клеточных мембранах (плазмолемме, мембранах эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, ядерной мембране). Поэтому липопротеидная оболочка этих вирусов представляет собой мембрану клетки-хозяина, модифицированную за счет наличия на ее наружной поверхности вирусных суперкапсидных белков. Белки, входящие в состав липопротеидной оболочки почкующихся вирусов, за счет структуры своей внутримембранной (гидрофобной) зоны имеют различное родство к различным липидам. Поэтому в зонах агрегации таких белков липидный состав мембраны отличается от состава в ннтактной клеточной мембране. Зоны агрегации мембранных вирусных белков формируют в составе мембраны области, через которые происходит почкование вирионов. Поэтому качественный состав липидов вирусных оболочек сходен с таковым у тех мембран, через которые происходит почкование, но отличен от него по количественному соотношению различных классов липидов.

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.

## **2.5 Вирусные углеводы**

Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов и гликолипидов.

Количество сахаров в составе гликопротеидов может быть достаточно большим, достигая 10—13% от массы вириона. Химическая специфичность их определяется клеточными ферментами, обеспечивающими перенос и присоединение соответствующих сахарных остатков, и структурой гликозилируемого белка. Обычными сахарными остатками, обнаруживаемыми в вирусных белках, являются фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, ней-раминовая кислота, глюкозамин. Углеводный компонент гликолипидов по своей структуре полностью определен клеткой. В то же время углеводный компонент гликопро-

теидов определяется, с одной стороны, клеткой-хозяином, а именно специфичностью ее гликозилтрансфераз, с другой стороны, вирусом, а именно структурой его гликозилируемых белков.

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.

## **2.6 Структура вирусов**

Отдельная вирусная частица получила название «вирион». Белковый чехол у изометрического вириона или белковая трубка у вириона со спиральной симметрией называется капсидом. Он может быть «голым» или заключенным в липопротеидную оболочку (пеплос), образующуюся из модифицированных клеточных мембран при созревании вируса путем почкования. Если капсид (чаще спиральный и реже изометрический) содержит нуклеиновую кислоту, такой комплекс называется нуклеокапсидом. У большинства изометрических и у всех сложных вирионов капсид включает в себе внутренний белок и нуклеиновую кислоту (вирусный геном), называемые сердцевиной.

Капсиды состоят из повторяющихся белковых субъединиц, каждая из которых образована одной или несколькими белковыми молекулами. Различают три уровня сложности. Химические единицы — это отдельные полипептиды; они образуют структурные (морфологические) единицы — капсомеры, которые могут состоять из одной или нескольких белковых молекул. Те из них, которые образуют выступы на липопротеидной оболочке вириона, называются пепломерами. Химические единицы, образуя структурные единицы, часто соединены дисульфидными связями. Структурные единицы удерживаются в составе капсида нековалентными связями. Капсиды некоторых вирусов легко разрушаются 1 М раствором хлорида кальция или натрия, что свидетельствует о наличии электростатического взаимодействия между структурными единицами. Однако другие единицы в солевых растворах не разрушаются и чувствительны только к детергентам, что указывает на гидрофобную природу связей.

Вирусы имеют два типа симметрии строения капсида: кубический и спиральный (трубчатый капсид). Структурными единицами капсида являются белковые субъединицы, состоящие из одной или нескольких молекул белка (рис. 12). Структурная единица вируса табачной мозаики состоит из молекул одного белка, вируса полиомиелита — из четырех молекул белка.

### **2.6.1 Вирусы с кубическим типом симметрии**

В данном случае капсомеры образуют полное изометрическое тело, в центре кото-

рого находится геном. Такая укладка называется кубическим типом симметрии. Последнее означает, что тело является симметрическим в трех взаимно перпендикулярных направлениях (осях симметрии) (рис. 13—15).

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 и чаще всего представлены гликопротеидами. Глико-протеиды формируют морфологические субъединицы, которые в электронном микроскопе имеют форму, подобную форме шипов.

Весьма сложное строение имеют вирионы осповакцины. Сердцевина их, содержащая вирусную ДНК в составе нуклеопротеида, имеет форму двояковогнутого кольца и окружена двумя линзообразными латеральными тельцами. Вирус имеет несколько оболочек, из которых наиболее сложное строение имеет наружная.

У ряда сложно устроенных вирусов капсид окружен дополнительными внутренними структурами (вирусным матриксом), образованными обычно внутренними белками. В этом случае внутренний компонент обозначают как сердцевина (core), или нуклеоид.

У всех вирусов кубической или спиральной симметрии, не имеющих наружной оболочки, величины диаметров нуклеокапсида и вириона идентичны, У вирусов же, имеющих наружную оболочку, диаметр вириона значительно превосходит диаметр нуклеокапсида,

Оболочки вирионов формируются при их созревании на внутренней стороне клеточной мембраны.

Из кристаллографии известны три типа фигур с кубическим типом симметрии: тетраэдр, октаэдр и икосаэдр. Последний тип симметрии наиболее экономичен.

У изометрических вирионов капсомеры в капсидах расположены в соответствии с икосаэдрической симметрией. Икосаэдр образован 20 равносторонними треугольниками; у него 12 вершин, в каждой из которых сходятся углы пяти треугольников, и 30 ребер, где соединяются прилегающие стороны соседних треугольников. Икосаэдр обладает симметрией второго порядка (всего их пять) относительно оси, проходящей через центр любого ребра, симметрией третьего порядка относительно оси, проходящей через центр любой треугольной грани, и симметрией пятого порядка относительно оси, проходящей через каждую вершину. Каждая треугольная грань содержит три асимметрические единицы (т. е. единицы, которые не имеют правильных осей симметрии), так что для построения икосаэдра необходимо минимум 60 асимметрических единиц.

Имеется три основных типа укладки структурных единиц; 1) три единицы, состав-

ляющие каждую треугольную грань, группируются у центра треугольника, образуя капсомеры-тримеры; 2) структурные единицы группируются около вершин треугольника, так что в тех местах, где пять граней сходятся у вершины икосаэдра, образуется капсомер-пентамер, а там, где шесть граней сходятся у вершины икосаэдра, образуется капсомер-гексамер; 3) пара структурных единиц прилегающих граней группируется у ребер, образуя капсомеры димеры. По расположению и размеру капсомеров можно оценить, сколько структурных единиц входит в каждый капсомер.

Установлены физические различия между вирусами со спиральной и икосаэдрической симметрией,

Все известные ДНК-содержащие вирусы животных обладают изометрическими (или сложными) капсидами; изометрические капсиды имеют также вирусы, геном которых представлен двуспиральной РНК, и вирусы геном которых представлен односпиральной РНК. Число капсомеров у разных вирусов с кубическим типом симметрии различно.

### **2.6.2 Вирусы со спиральным типом симметрии (с трубчатым нуклеокапсидом)**

В этом 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, ортомиксо-, парамиксо-, 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.

Больше, чем о структуре любого другого вируса, известно о физической и химической структуре вируса табачной мозаики. Вирионы представляют собой прямые стержни без липопротеидной оболочки, которые состоят из 2130 повторяющихся химических единиц, являющихся одновременно и структурными единицами, и капсомерами. Эти белковые молекулы уложены в спираль таким образом, что по отношению к продольной оси стержня все капсомеры (за исключением концевых) находятся в одинаковом положении.

Трубчатые нуклеокапсиды характерны для тех вирусов позвоночных, у которых геном представлен односпиральной РНК. Такие нуклеокапсиды не являются «голыми» вирионами, гибкие спиральные трубки всегда заключены в липопротеидную оболочку. Диаметр нуклеокапсидов был измерен у ряда вирусов, но шаг спирали известен лишь у некоторых. Поверхность контакта между соседними витками спирали коническая, поэтому контакт сохраняется даже при резком изменении кривизны нуклеокапсида и вирусная РНК всегда оказывается надежно защищенной.

### **2.6.3 Взаимное расположение нуклеиновой кислоты и капсомеров**

Геном любой вирусной частицы представлен единственной нуклеиновой кислотой: либо РНК, либо ДНК (исключение составляют ортомиксо- и аренавирусы, содержащие малые количества хозяйской тРНК). Характер взаимодействия между вирусной нуклеиновой кислотой и капсомерами при спиральной и икосаэдрической симметрии нуклеокапсида различается.

У икосаэдрических вирусов такого регулярного взаимодействия между нуклеиновой кислотой и каждой белковой субъединицей нет. У наиболее простых изометрических вирусов гибкая односпиральная РНК может сворачиваться с той или иной степенью упорядоченности по отношению к капсомерам и составляющим их химическим субъединицам. Простые изометрические вирусы имеют сложную структуру, поскольку они содержат несколько разных вирусспецифических полипептидов; один или несколько полипептидов расположены внутри капсида, и именно они, а не капсомеры, взаимодействуют с вирусной РНК.

Белки более крупных ДНК-содержащих вирусов расположены в несколько слоев, не всегда симметричных. Внутренние белки многих ДНК-содержащих вирусов обладают ярко выраженными основными свойствами; они связаны с вирусной нуклеиновой кислотой, образуя вместе с ней сердцевину внутри изометрического капсида.

## **2.7 Вирусные липопротеидные оболочки**

Под оболочкой вириона подразумевается наружный липопротеидный слой, который формируется в процессе почкования вируса на клеточной мембране. Вирусы, имеющие липопротеидную оболочку, на 20—30,% состоят из липидов, которые локализованы исключительно в оболочке. Липиды имеют клеточное происхождение и попадают и состав вириона из клеточной мембраны при почковании, в то время как белки липопротеидной оболочки вирусспецифические. Вирусы рода *Herpesvirus* — это единственные из вирусов позвоночных, которые почкуются на ядерной мембране, и оболочка их содержит несколько вирусспецифических гликопротеидов. Остальные вирусы с гликопротеидной оболочкой почкуются на плазматической мембране и содержат один или несколько разных полипептидов. Вирусы, относящиеся к семейству *Togaviridae*, имеют изометрический капсид, к которому непосредственно прилегает липидный слой; из него выступают наружу вирусспецифические гликопротеидные пепломеры.

Все вирусы животных с трубчатыми нуклеокапсидами обладают липопротеидной оболочкой. У них липидный слой с выступающими пепломерами прилегает к белковому чехлу (мембранному белку, см. рис. 12), который может быть относительно жестким, как у вирусов семейства *Rhabdoviridae* (везикулярный стоматит, бешенство), и легко деформируемым, как у миксовирусов, поэтому вирионы на электронных микрофотографиях

при негативном контрастировании имеют полиморфный вид.

## **2.8 Структура фагов**

У Т-четных и некоторых других фагов, имеющих отросток, имеется два типа симметрии. Головка их построена в виде, икосаэдра, а отросток — в виде винта (рис. 22).

На рисунке. 23 приведена схематическая модель фага Т2. Головка этого фага состоит из однородных белковых молекул, образующих полый многогранник, внутри которого уложена двойная нить ДНК. Полиамины (спермидин, путресцин) вместе с ионами магния являются катионами, нейтрализующими заряд и стабилизирующими ДНК. Кроме того, в головке фага имеется полипептид, состоящий преимущественно из аспарагиновой, глутаминовой кислот и лизина, а также Х-белок, назначение которого неизвестно. Все они в сумме составляют 2% белка фага.

Головка сообщается отверстием с полым стержнем, который оканчивается шестигранной пластинкой с шестью шипами и шестью фибриллами. Стержень окружен чехлом, прикрепленным к воротничку, окружающему стержень около головки; чехол обладает способностью сокращаться наподобие мышц (Келлин-бергер, 1961). Отросток имеет периодическое строение, образованное уложенными спиралью морфологическими единицами. Конец отростка имеет энзиматическую активность типа лизоцима. У Т-четных фагов 40% его массы составляет белок и 60% — ДНК. Головка содержит 1 тыс. белковых единиц. Чехол составлен из 140—200 единиц сокращающегося белка.

## **3. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ**

Современная универсальная система классификации вирусов использует иерархические уровни (таксоны), соответствующие порядку, семейству, подсемейству, роду и виду.

### **3.1 Номенклатура вирусов.**

Для упорядочения наименований вирусов выработан ряд правил. Название семейств оканчивается на «viridae», подсемейств — «virinae», рода — «virus». В названиях допускаются привычные латинизированные обозначения, цифры и обозначения типов, сокращения, буквы и их сочетания

Правила номенклатуры вирусов дают определения виду, роду и семейству.

Вид вируса - это понятие, представляющее группу штаммов из различных источников, или популяцию штаммов из одного источника, которые в целом обладают набором коррелирующих стабильных свойств, отделяющих данную группу от других групп штаммов. В 1966 году МКТВ принял следующее определение вид - это класс вирусов, характе-

ризующийся большим числом критериев, образующий реплицирующуюся линию и занимающий особую экологическую нишу. Это определение учитывает вариабельность вирусов и не зависит от какого-либо единственного уникального параметра.

Род - это группа видов с определенными общими характеристиками и отличающаяся от вирусов других родов. Критерии для выделения родов различаются у разных семейств и могут включать:

- феномены генетических взаимодействий;
- круг восприимчивых хозяев;
- патогенность;
- географическое распространение;
- способ передачи;
- антигенные свойства.

Семейство - это группа родов с общими характеристиками, отличающаяся от других семейств. Основные критерии, используемые для деления на семейства, включают фундаментальные свойства вирионов:

- тип и структуру нуклеиновой кислоты;
- наличие липопротеиновой оболочки;
- стратегию вирусного генома; размер и морфологию вирионов.

### **3.2 Критерии систематики вирусов**

Основными критериями подразделения разных групп вирусов на семейства являются особенности нуклеиновых кислот, касающиеся их структуры (одно-двухцепочечные, полные-недостроенные, цельные-фрагментированные), конфигурации (линейные-кольцевые) и геномной функции («плюс-минус» нитевые), а также наличие или отсутствие внешней оболочки. Дополнительными критериями, позволяющими в пределах семейства выделить подсемейства, роды и виды, являются круг хозяев, антигенная специфичность, размеры и морфология вирионов, тип симметрии и число капсомеров в капсиде, органно-тканевой тропизм вирусов и их цитопатическое действие, способы передачи, распространение, проявление вирусных болезней и некоторые другие.

Учитывая, что семейство является наиболее крупным таксоном вирусов, кратко остановимся на характеристике упомянутых свойств вирионов.

#### **Семейства, подсемейства, роды и виды ДНК-вирусов**

Группа ДНК-содержащих вирусов представлена 7 семействами, четыре из них - вирусы позвоночных, а в остальных трех имеются подсемейства, роды и виды, вызывающие болезни у насекомых.

#### **Вирусы позвоночных**

1. Herpesviridae (греч. herpes - ползучие) - дермотропные вирусы, вызывающие у человека линейно распространяющиеся на коже и слизистых оболочках везикулезные высыпания, наполненные жидким содержимым, в частности на губах (простой герпес) и в межреберьях (опоясывающий герпес). Семейство включает три подсемейства: Alpha-, Beta- и Gammaherpesvirinae, в состав которых входят вирусы простого герпеса, опоясывающего герпеса/ветряной оспы, псевдобешенства ( $\alpha$ -подсем.), цитомегаловирусы человека и мышей ( $\beta$ -подсем.), онкогенные лимфотропные вирусы Эпштейна-Барр и болезни Марекка ( $\gamma$ -подсем.).

2. Adenoviridae (греч. adenos - железа) - вирусы, выделенные из железистой ткани носоглотки и поражающие у человека верхние дыхательные пути, а нередко и кишечник. Семейство включает два рода: Mastadenovirus (греч. mastos - грудь) - вирусы млекопитающих и Aviadenovirus (лат. avis - птица) - птичьих вирусы. Среди мастаденовирусов различают 31 вирус человека (под-роды B, C, D, E) и 11 вирусов животных (крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, свиней, собак, мышей), а среди авиаденовирусов - аденовирусы кур (2), индеек (2), уток, гусей и фазанов.

3. Papovaviridae - вирусы шпилемы, пцлиомы и вакуолизирующий клетки вирус SV-40 (англ. spuma - пенистый, virus) - семейство, включающее два рода: Papillomavirus, вызывающие доброкачественные разрастания кожи и слизистых оболочек (лат. papilla - сосочек), и Polyomavirus (в том числе SV-40), индуцирующие множественные (греч. polys - много) опухоли (ома) у животных.

4. Hepadnaviridae (греч. hepatos - воспаление печени, DNA - ДНК) - вирион гепатита В (частица Дейна) и подобные ему вирусы вызывающие заболевание у сурков, пекинских уток, земляной и красной белок.

#### Вирусы позвоночных и беспозвоночных

1. Poxviridae (англ. pox - пузырек) - как и герпесвирусы, являются дермотропными вирусами, вызывающими на коже и слизистых оболочках человека и животных разнообразные высыпания, заканчивающиеся образованием не только везикул, но и пустул, наполненных гнойным содержимым и покрытых корками, после отпадения которых остаются глубокие рубцы (натуральная оспа человека). Семейство подразделяется на 2 подсемейства - Chordopoxvirinae (вирусы позвоночных) и Entomopoxvirinae (вирусы насекомых). В составе хордопоксвирусов выделяют 6 родов и 7 типов вирусов оспы человека и животных: Orthopoxvirus (оспенный и вакцинный вирусы), Parapoxvirus (вирус пустулезного дерматита), Avipoxvirus (птичий), Capripoxvirus (овечий), Suipoxvirus (свиной), Leporipoxvirus (вирус миксомы зайцев). Подсемейство этомопоксвирусов включает три рода вирусов насекомых.

2. Iridoviridae (греч. iridos - радуга) — отличаются тем, что, кристаллизуясь, вирусы отливают всеми цветами радуги. Представлены пятью родами: Iridovirus и Chloriridovirus (греч. chloros -зеленовато-желтый) - вирусы насекомых, Ranavirus - вирусы лягушек; четвертый и пятый безымянные роды включают вирус лимфокистоза рыб (4) и вирус африканской чумы свиней (5).

3. Parvoviridae (лат. parvus - крошечный) включает 3 рода: Parvo-virus - вирусы животных и птиц; Densovirus (лат. densus - плотный) - вирусы насекомых; Dependovirus (англ. dependence - зависимость) - аденоассоциированные вирусы, точнее, дефектные вирусы, репликация которых возможна лишь с помощью аденовирусов.

### **3.3. Краткая характеристика основных структур и свойств ДНК-вирусов**

Структура ДНК. У герпес-, иридо- и аденовирусов ДНК двухцепочечная линейная и, если не считать повторов нуклеотидных последовательностей начальных участков и концевых ее фрагментов, то она точно такая же, как в клетках; у поксвирусов - линейная двухцепочечная, но с замкнутыми концами; у паповавирусов - двухцепочечная кольцевая, иногда со сверхзавитками; у гепаднавирусов - кольцевая двухцепочечная, но в одной нити на четверть недостроенная; у парвовирусов - одноцепочечная линейная.

Наличие внешней оболочки, форма и размеры. Вирионы покс-, герпес-, иридо- и гепаднавирусов имеют внешнюю оболочку адено-, папова-, парвовирусы - простые типичные нуклеокапсиды. Поксвирионы имеют форму параллелепипеда (у парапоксвируса - овальная), герпес-, иридо-, гепаднавирионы - округлую, адено-, папова- и парвовирионы - икосаэдральную. Размеры поксвирусов колеблются в пределах 300-450×170-260 нм, диаметр герпес- и иридовирусов превышает 100 нм и может достигать 200 нм, у аденовирусов он меньше - 100 нм (в среднем 90 нм), у паповавирусов - около 50 нм, у гепаднавирусов - приблизительно 40 нм, а у самого маленького простого парвовируса - на порядок меньше, чем у самых крупных сложных вирусов. (18-26 нм).

Репликация, сборка и освобождение вирионов из клеток. Репликация и сборка покс-, герпес- и иридовирусов происходит в цитоплазме, остальных вирусов - в ядре.

Сложные вирионы клеток не разрушают и отделяются от нее почкованием (герпесвирусы проходят сквозь плазматическую мембрану, сливаясь с нею), адено- и паповавирусы освобождаются, лизируя их.

Подводя итоги, приводим классификацию ДНК-вирусов (с. 25) по основным критериям Международного Комитета по таксономии вирусов (МКТВ).

### **3.4 Семейства, роды и виды РНК-вирусов**

Группа РНК-содержащих вирусов включает 12 классифицированных и 2 предполагаемых семейства Filo- и Birnaviridae. Среди классифицированных вирусов 9 семейств по-

звоночных, а 3 - сборные, в состав которых входят роды и виды позвоночных, насекомых и растений.

Вирусы позвоночных. По органно-тканевому тропизму среди вирусов позвоночных можно выделить 4 группы: энтеро- пневмо, вазо- и лимфотропные.

1. К энтеротропным вирусам относят два семейства: Picornaviridae (итал. piccolo - маленький, RNA - РНК), т. е. РНК-вирусы, отличающиеся очень маленькими размерами, и Caliciviridae (лат. calix - чаша), выделенные не так давно из семейства вирусов пикорна после того как на поверхности их вирионов было обнаружено 32 чашевидных вдавления.

Семейство пикорнавирусов имеет 4 рода: Entero-, Сагшо-, Rhino- и Aphthovirus.

В составе энтеровирусов насчитывают 72 типа: Poliovirus (греч. polios ~ серый) 1, 2 и 3 типа, поражающие серое вещество передних рогов спинного мозга и вызывающие полиомиелит; Coxsackievirus А - 24 типа и В - 6 типов (Коксаки - город в США, где они были выделены) и 34 типа ЕСНОvirus (enteric cytopathogenic human orphans), являющиеся возбудителями полиомиелитоподобных заболеваний, ангин и миозитов; 4 типа вирусов гастроэнтеритов (68-71) и вирус гепатита А (72 типа).

Риновирусы (греч. rhinos - нос) вызывают риниты (113 типов), кардиовирусы (греч. kardia - сердце) - миокардиты, а афтовирусы (греч. aphta- язва) - ящур у парнокопытных животных.

Семейство калицивирусов - типичные энтеровирусы, вызывающие гастроэнтериты.

2. В группу пневмотропных включают три семейства вирусов: Orthomyxo-, Paramyxо- и Coronaviridae. Первые два семейства называют миксовирусами, так как они имеют высокое сродство к слизистой оболочке верхних дыхательных путей (греч. туха - слизь), более выраженное у ортомиксовирусов (греч. orthos - настоящие), чем у парамиксовирусов (греч. пара - подобные).

Семейство ортомиксовирусов включает 3 типа вирусов гриппа - А, В (род Influenzavirus) и С (безымянный род), а семейство парамиксовирусов - вирусы парагриппа и эпидемического паротита (род Paramyxovirus), вирус кори (род Morbillivirus) и респираторно-синтициальные вирусы (род Pneumovirus).

Семейство коронавирусов (лат. corona - венец) получило свое название вследствие того, что составляющие его вирионы обрамлены частоколом «булавовидных утолщений». Все они вызывают острые респираторные заболевания.

3. К вазотропным вирусам, обладающим сродством к сосудам, относят семейства Togaviridae (лат. toga - мантия), иными словами, вирусы, содержащие внешнюю оболочку, Flaviviridae (лат. flavum - желтый), типовым представителем которого является вирус желтой лихорадки, Arenoviridae (лат. arena - песчинки), в сердцевине которых имеются плот-

ные гранулы, и Bunyaviridae, выделенные в Буньямвере (Уганда).

При этом семейство тогавирусов содержит около 30 видов вирусов, а том числе 3 типовых вируса энцефалитов лошадей, О'ньонг-ньонг и Синдбис, а флавивирусов - более 40 с наличием в их составе широко распространенных вирусов клещевого и японского энцефалитов, денге и краснухи, которые, как и флавивирус желтой лихорадки, тоже считаются типовыми.

Семейство ареновирусов включает вирус лимфоцитарного хориоменингита и 3 вируса геморрагических лихорадок - Ласса (африканской), Мачупо (боливийской) и Хунин (аргентинской).

Семейство буньявирусов подразделяют на 4 рода: Bunyavirus, включающий вирусы Буньямвера и многие другие вирусы экзотических природно-очаговых болезней (около 150); Flebovirus (flebotomus — вид москитов-переносчиков), в состав которого входят вирусы москитной лихорадки и еще более 50 видов Nairovirus, к которому отнесены около 40 вирусов, подобным вирусу Найроби овец; Uukuvirus, или вирусы, подобные вирусу Укуниими (более 20 вирусов).

4. Лимфотропные вирусы - это одно семейство Retroviridae, вирионы которого содержат реверсальную (обратную) транскриптазу. Отсюда и название Retro. Семейство подразделено на три подсемейства: 1) Oncovirinae - онкогенные вирусы В, С и D типов, вызывающие у животных рак молочной железы, лейкозы и лимфом саркому; 2) Spumavirinae (пенящие вирусы) с идентичным родом; Spumavirus; 3) Lentivirinae с таким же родом Lentivirus, включающий вирус висна-мэди у овец и подобные ему вирусы медленных инфекций. К ретровирусам причислен также вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), или, как его еще называют, вирус СПИД.

Вирусы позвоночных, растений и насекомых. К этой категории вирусов относят два семейства: Rhabdoviridae (греч.) rhabdos - прут, т. е. продолговатые), которые, как и все вышеперечисленные вирусы, содержат одноцепочечную РНК и вызывают у животных и человека rabies (бешенство), и Reoviridae (respiratory, enteric, orphans) - двухцепочечные РНК-вирусы-сиротки, поражающие респираторные пути и кишечник.

В семействе рабдовирусов имеется 3 рода: Lissavirus - вирусы бешенства (lissa); Vesiculovirus - вирусы везикулярного стоматита; безымянный род рабдовирусов растений.

Семейство реовирусов содержит 6 родов: Reovirus - вирусы; человека и животных; Orbivirus (лат. orbis - кольцо) - кольцевидные вирусы лихорадочных заболеваний человека; Rotavirus (греч. rota - колесо) - колесовидные вирусы гастроэнтеритов; Phytoreovirus и Fijivirus - фитопатогенные вирусы; Cypovirus и вирус цитоплазматического полиэдроза насекомых.

Предполагаемые семейства Filo- и Birnaviridae

Роды вирусов в обоих предполагаемых семействах не установлены. Недостаточно хорошо изучены и виды вирусов, их представляющие.

В семейство Filoviridae (греч. phylon - род, племя) включены два особоопасных для человека вируса - Марбург и Эбола. Ее диаметр у обоих вирусов равен 80 нм, а длина нити варьирует, но у Марбург чаще равна 790 нм, а у Эбола — 970 нм. Вирионы имеют внешнюю оболочку, поверхность их неровная с выступами, РНК одноцепочечная, предположительно минус-нитевая. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка вирионов включает этап отпочковывания от клеточной мембраны.

Вирионы семейства Birnaviridae, как и Reoviridae, содержат двухцепочечную фрагментированную РНК, но сегментирована она не на 8, а на 2 участка. Как и реовирусы, они лишены внешней оболочки, имеют икосаэдрическую симметрию и такие же размеры (80 нм). Репликация и сборка бирнавирусов происходит тоже в цитоплазме, но высвобождаются они при разрушении клеток.

### **3.5 Краткая характеристика основных структур и свойств классифицированных семейств РНК-вирусов**

Структура РНК. У РНК-содержащих вирусов, не считая семейств рео- и бирнавирусов, геномные РНК одноцепочечные структуры. При этом вирусные РНК, как и рибосомальные, информационные и транспортные, в разных клетках являются линейными цельными (несегментированными) структурами. Исключение составляют фрагментированные на 8 сегментов РНК у ортомиксовирусов и на 2 сегмента у ареновирусов. У пикорна-, калици-, тога-, арено-, флави- и ретровирусов цельно-линейная геномная РНК наделена функцией иРНК. У всех остальных семейств линейные РНК независимо от того, сегментированы они или нет, такой функцией не обладают; выполняют ее комплементарные им иРНК, транскрипция которых осуществляется в клетке на геномных с помощью вирусоспецифических транскриптаз. Особую структуру РНК имеют бунья- и реовирусы. У первых она кольцевая и фрагментированная на 3 сегмента, у вторых - двухцепочечная, сегментированная на 10-12 участков.

Наличие внешней оболочки, форма и размеры вирионов.

9 семейств РНК-содержащих вирусов имеют внешнюю оболочку, у трех- пикорна-, калици- и реовирусов - она отсутствует. Из 9 сложных вирионов у 8 - форма округлая с поверхностными шипами вокруг вирионов (у коронавирусов - с булабовидными выступами), у одного (рабдовирусы) - пулевидная или бациллярная. Три простые вириона, у которых внешней оболочки нет, - икосаэдры.

Размеры самых больших вирионов парамиксо- и рабдовирусов варьируют в преде-

лах 150-300 нм, 130-380×50-90 нм соответственно, самых маленьких - тога- и флави-, калици- и особенно пикорнавирусов - 40-60; 35-39; 22-30 нм. Диаметры вирусных частиц у рео-, ортомиксо-, ретро- и буньявирусов колеблются - 60-80; 80-90 и 100-120 нм. Более переменны размеры корона - (75-160 нм) и ареновирусов (50-300 нм).

Репликация, сборка и освобождение вирионов из клеток. Репликация РНК-вирусов происходит в цитоплазме клеток. Ядерный цикл репликации характерен лишь для ортомиксовирусов, но и он заканчивается в цитоплазме. В ней же идет сборка вирионов с последующим отпочковыванием от плазматической мембраны, реже от внутрицитоплазматических мембран (короновирусы и вирус бешенства) и от мембран аппарата Гольджи (буньявирусы). Не почкуются пикорна- и калицивирусы. Почкующиеся РНК-вирусы клеток не разрушают, не почкующиеся, (постепенно накапливаясь, лизируют их).

### 3.6 Порядки

Порядки принципиально новые таксоны высшего в царстве *Vira* иерархического ранга, установленные в последнее время

МКТВ и объединяющие близкие семейства вирусов Их представители обладают гомологичными полимеразными белками, общими последовательностями в генах нуклеокапсидных белков, одинаковым расположением генов, аналогичными генными продуктами. Выделены два порядка:

- Mononegavirales, включающее семейства *Piloviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bomaviridae*;
- Nidovirales, включающее семейства *Arteriviridae* и *Coronaviridae*.

МКТВ разработаны правила номенклатуры, описания и наименования вирусов. Эти правила включают следующие положения:

- система бактериальной номенклатуры не применима к вирусам;
- номенклатура должна быть международной; номенклатура должна быть универсально применимой ко всем вирусам;
- существующие названия должны быть сохранены всякий раз, где это возможно;
- закон приоритета не должен соблюдаться; сокращения могут быть приняты в качестве групповых названий вирусов, если они имеют смысл для работающих в этой области и рекомендованы международной группой изучения;
- персональные имена не используются;

- имена должны иметь интернациональное значение;
- правила орфографии имен существительных и прилагательных должны соответствовать установленным в специальном протоколе совещания МКТВ;
- вид вирусам - это понятие, которое обычно представлено группой штаммов из различных источников, или популяций штаммов из одного источника, которые в целом обладают набором коррелирующих стабильных свойства, отделяющих группу от других групп штаммов;
- название вируса вместе с обозначением штамма должно однозначно идентифицировать его без необходимости включать родовое или групповое имя;
- название вируса должно нести смысловую нагрузку и состоять из любого числа слов;
- можно использовать числа, буквы и их комбинации в качестве официальных обозначений там, где эти буквы и цифры уже широко используются для отдельного вируса;
- вновь «сконструированные» серийные номера, буквы, комбинации не принимаются сами по себе для обозначения вида;
- искусственно полученные лабораторные гибриды различных вирусов таксономией не рассматриваются;
- одобрение МКТВ вновь предложенных названий видов происходит в две стадии. Сначала дается предварительное одобрение. Предварительно одобренные предложения публикуются в отчете МКТВ. Затем, после трехлетнего периода, предложение может быть окончательно одобрено МКТВ;
- род - это группа видов с определенными близкими характеристиками;
- название рода должно быть единственным смысловым словом, оканчивающимся на «...virus»;
- семейство - это группа родов с общими характеристиками с окончанием названия на «...viridae»;
- одобрение нового семейства должно быть связано с одобрением типового рода, одобрение нового рода должно быть связано с одобрением типового вида.

Описание и наименование видов также осуществляется в соответствии с опреде-

ленными требованиями МКТВ.

- Критерии описания видов могут изменяться в различных семействах вирусов.
- Везде, где можно, следует избегать повторения уже одобренных названий.
- Если необходимо заменить типовой вид, в МКТВ подается таксономическая заявка.
- В будущей номенклатуре следует избегать подстрочных, надстрочных обозначений, дефисов, косых полос, греческих букв.
- При утверждении новых названий вируса должны учитываться национальные особенности языков. Если название универсально используется вирусологами (публикующимися в журналах), название и его производные необходимо использовать безотносительно к национальному источнику. Если различные названия используются вирусологами различных национальностей, необходимо оценить относительное международное использование, которое будет принято большинством и которое не будет оскорбительным в каком-либо языке.

МКТВ не касается классификации и наименования штаммов, вариантов и серотипов. За это отвечают референсные центры, лаборатории, специалисты.

В настоящее время известно более 4000 вирусов, отнесенных к 164 родам и объединенных в 71 семейство.

## **4. РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ**

### **4.1 Общее представление о репродукции вирусов**

Вирусы воспроизводят себе подобные частицы в таком огромном количестве и столь своеобразными способами, что это явление стали именовать репродукцией, так как здесь копируются молекулы нуклеиновых кислот и, согласно заключенной в них генетической информации, синтезируются вирусные белки. Каковы же биологические и генетические особенности механизмов репродукции вирусов?

Первая и принципиальная особенность вирусов, отличающая их от других организмов, та, что геномы их представлены молекулами как ДНК, так и РНК,

Вторая особенность заключается в большом разнообразии структуры и формы их геномов (одно-, двуспиральные ДНК, одно-, двуспиральные РНК, кольцевые формы нуклеиновых кислот), геномы РНК-содержащих вирусов могут быть представлены как одной молекулой, так и несколькими (до 12) различными молекулами РНК - такие геномы назы-

ваются фрагментированными

Третья особенность вирусов состоит в том, что почти все вирусные РНК способны реплицироваться независимо от ДНК клетки, тогда как клеточные РНК (рРНК, иРНК, тРНК) синтезируются на матрице клеточной ДНК.

Четвертая особенность — дизъюнктивный (разобщенный во времени и пространстве) биосинтез их структурных компонентов. При этом вирусная нуклеиновая кислота может быть транскрибирована непосредственно в составе нуклеокапсида или нуклеоида. Нуклеиновая кислота вируса может реплицироваться, например, ядре или ядрышке, белок может синтезироваться в цитоплазме, а сборка целых вирионов или нуклеокапсидов может происходить на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Наконец, сложный липопротеиновый суперкапсид может приобретаться вирусами в процессе почкования.

Пятая кардинальная особенность: вирусы не имеют собственных белоксинтезирующих систем, а используют «в наем» эти системы клетки.

И, наконец, шестая особенность вирусов заключается в большом разнообразии самих механизмов репликации их вирусных нуклеиновых кислот и репродукции вирусных частиц.

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 пять стадий:

- 1) транскрипции;
- 2) трансляции иРНК;
- 3) репликации генома;
- 4) сборки вирусных компонентов и
- 5) выход вируса из клетки.

## **4.2 Первая фаза репродукции**

### **4.2.1 Адсорбция вирионов на поверхности клетки**

Прикрепление вирусных частиц к поверхности клетки-хозяина — первая стадия инфекционного процесса. Начальный контакт вируса с клеткой происходит в результате

случайного столкновения по типу броуновского движения.

В основе адсорбции лежат два механизма. Первый из них (неспецифический) определяется силами электростатического взаимодействия, возникающими между разноименно заряженными группами, расположенными на поверхности клетки и вирусами. Второй — специфический. Специфичность связи между вирусом и клеткой обусловлена комплементарными клеточными и вирусными рецепторами.

Процесс адсорбции возможен при наличии соответствующих рецепторов. Узнавание клеточных рецепторов вирусными белками (рецепторами), является высокоспецифическим процессом.

Максимальная скорость адсорбции вируса наблюдается лишь при определенном соотношении концентрации вируса и клеток, влиянии pH, температуры, ионного состава среды.

Процесс адсорбции состоит из двух быстро следующих друг за другом периодов: обратимого и необратимого. Период обратимого прикрепления может закончиться десорбцией. При длительном контакте вируса с клеткой никакие воздействия не позволяют освободить адсорбированный вирус, наступает стадия необратимой адсорбции.

Вирусные прикрепительные белки (вирусные рецепторы).

У просто организованных вирусов млекопитающих содержатся прикрепительные белки в составе капсида. У сложно организованных вирусов эти белки входят в состав суперкапсида и представлены разнообразными молекулами.

#### **4.2.2 Проникновение вирусов в клетку**

Исторически сложилось представление о двух альтернативных механизмах проникновения в клетку вирусов животных — путем эндоцитоза и путем слияния вирусной и клеточной мембран. Однако оба эти механизма не исключают, а дополняют друг друга.

Эндоцитоз означает, что вирусная частица попадает в цитоплазму в результате инвагинации участка плазматической мембраны и образования вакуоли, которая содержит вирусную частицу.

Рецепторный эндоцитоз. 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

Большинство оболочечных и безоболочечных вирусов животных проникает в клетку по механизму рецепторного эндоцитоза. Эндоцитоз обеспечивает внутриклеточный транспорт вирусной частицы в составе эндоцитарной вакуоли. Таким путем, например,

ядерные вирусы попадают в ядро, а реовирусы в лизосомы.

Слияние вирусной и клеточной мембран. Для того чтобы внутренний компонент вируса мог пройти через клеточную мембрану, ряд оболочечных вирусов эволюционно приобрел механизм индукции 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.

Вирусы вызывают два типа слияния клеток: 1) слияние снаружи и 2) слияние изнутри. Слияние снаружи происходит при высокой множественности инфекции. Напротив, слияние изнутри происходит при низкой множественности инфекции.

#### **4.2.3 Раздевание вируса в клетке**

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.

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

Раздевание ряда вирусов происходит в специализированных участках внутри клетки (лизосомах, структурах аппарата Гольджи, околядерном пространстве, ядерных порах на ядерной мембране).

### **4.3 Вторая фаза репродукции**

#### **4.3.1 Транскрипция**

Это переписывание информации с ДНК на РНК по законам генетического кода. Транскрипция осуществляется специальным ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

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 (иРНК). На этом основана центральная догма молекулярной биологии, которая выражается следующей формулой:



где стрелки показывают направление переноса генетической информации.

Транскрипция в зараженной клетке. Синтез комплементарных РНК на родительских матрицах с помощью родительской транскриптазы носит название первичной тран-

скрипции 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.

#### **4.3.2 Трансляция информационных РНК**

Синтез белка в клетке происходит в результате трансляции иРНК. Трансляцией называется процесс перевода генетической информации, содержащейся в иРНК, на специфическую последовательность аминокислот. Транспортные РНК. Связывание конкретной тРНК и аминокислоты осуществляет фермент аминоацилсинтетаза, который имеет два центра связывания-узнавания: один для соответствующей тРНК, другой для аминокислоты.

Рибосомы. Синтез белка в клетке осуществляется на рибосомах. Рибосома состоит из двух субъединиц — большой и малой, малая субъединица примерно в 2 раза меньше большой. Обе они содержат по одной молекуле рибосомальной РНК и ряд белков.

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.

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.

Терминация трансляции. Она происходит в тот момент, когда рибосома доходит до терминирующего кодона в составе иРНК. Трансляция прекращается, и полипептидная цепь освобождается из полирибосомы.

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 освобождавшихся рибосомах начинается трансляция одиночных молекул вирусных иРНК. Специфическое узнавание рибосомой вирусных иРНК осуществляется за счет вирусспецифических инициаторных факторов.

Два способа формирования вирусных белков. 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.

Вирусспецифические полисомы. Поскольку длина вирусных иРНК варьирует в широких пределах, размер вирусспецифических полисом также широко варьирует: от 3—4 до нескольких десятков рибосом на одной нити иРНК.

Вирусспецифические полисомы могут быть как свободными, так и связанными с мембранами. Внутренние белки обычно синтезируются на свободных полисомах, гликопротеиды всегда синтезируются на полисомах, связанных с мембранами.

Модификация вирусных белков. В эукариотической клетке многие вирусные белки подвергаются посттрансляционным модификациям. Широко распространены такие посттрансляционные ковалентные модификации, как гликолизирование, ацилирование, метилирование, сульфирование (образование дисульфидных связей), протеолитическое нарезание и, наконец, фосфорилирование.

Гликозилирование. В процессе гликозилирования происходят последовательное присоединение углеводных остатков к углеводной цепочке в процессе транспорта полипептида к плазматической мембране.

Сульфирование. Связывание сульфатной группы с углеводными остатками гликопротеида,

Ацилирование. Ряд гликопротеидов сложно устроенных РНК-содержащих вирусов 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, либо с образованием одного функционально активного белка и неактивного фермента. Нарезание обычно осуществляется клеточными ферментами.

#### **4.3.3 Репликация генома вирусов**

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

репликации клеточной ДНК. Поскольку типы и формы вирусных нуклеиновых кислот весьма разнообразны, то механизмы их репликации тоже различны.

Синтез вирусных ДНК осуществляется с помощью ДНК-полимераз, источники которых могут быть различны. Благодаря участию этого фермента из нуклеотидов клетки синтезируется и строится вторая комплементарная нить ДНК, в результате чего образуются новые двуспиральные молекулы ДНК.

Репликация одноцепочечных вирусных ДНК. Одноцепочечные вирусные ДНК синтезируются по принципу комплементарности с образованием промежуточной репликативной формы. В составе вирионов в качестве структурного компонента имеется ДНК-зависимая ДНК-полимераза. С помощью этого фермента по принципу комплементарности на вирусной односпиральной ДНК (плюс-нити) образуется одна комплементарная ей минус-нить. В дальнейшем на этой двуспиральной структуре синтезируются дочерние плюс-нити (матрицей для них являются минус-нити).

Репликация односпиральных вирусных РНК. Репликация вирусных РНК осуществляется без непосредственного участия клеточных ДНК.

Одноцепочечные инфекционные РНК вирусов содержат в себе всю генетическую информацию, необходимую для синтеза вирусспецифических белков, и являются, таким образом, информационными (иРНК) с матричными функциями. После проникновения этих вирусов в клетку их инфекционные РНК поступают непосредственно в рибосомы и индуцируют синтез вирусных белков, в том числе РНК-репликазы, катализирующей репликацию самих вирусных РНК.

У односпиральных молекул РНК с кодирующими и матричными функциями (плюс-РНК) процесс репликации происходит таким образом, что на исходной вирусной молекуле РНК (на плюс-нити) с участием фермента РНК-репликазы синтезируется вторая комплементарная минус-нить РНК, в результате чего образуется двуспиральная репликативная форма РНК. Многочисленные плюс-нити вирусных инфекционных РНК войдут затем в новые частицы вирусного потомства.

Минус-нити образуются на ранней стадии инфекции, и максимальный уровень их синтеза предшествует появлению плюс-нитей. Минус-нити, синтезированные вирионной РНК-транскриптазой на ранней стадии инфекции, являются иРНК.

Синтез РНК может осуществляться по одному из двух механизмов: 1) консервативному, при котором полинуклеотидные цепи, входящие в состав Репликативной Формы РНК, консервируются и не переходят в односпиральную форму. Этот способ синтеза аналогичен способу синтеза односпиральных клеточных РНК на двуспиральной матрице ДНК; 2) образование плюс-нитей может происходить асимметрическим полуконсерватив-

ным путем, когда вновь строящаяся плюс-нить вытесняет ранее синтезированную плюс-нить из Репликативных Форм РНК.

Конечным продуктом синтеза в обоих случаях является односпиральная вирусная РНК.

РНК-транскриптаза и РНК-полимераза обнаружены в клетках, зараженных вирусом пикорнавирусами. Одна из них осуществляет синтез двуспиральной РНК, а другая продуцирует односпиральную плюс-РНК.

Репликация односпиральных вирусных РНК с негативным геномом. Имеется обширная группа односпиральных РНК-содержащих вирусов (пара- рабдо- и ортомиксовирусы), которые содержат негативный (неинфекционный) геном. По составу, локализации, функции и особенностям биосинтеза белков вирусы этой группы весьма сходны. У них единая стратегия экспрессии генов. РНК их (минус-нить) не транслируется в рибосомах. Функции иРНК у этих вирусов выполняют плюс-нити, комплементарные геномным. В составе вирусов с негативным геномом нет вирусспецифического фермента типа РНК-репликазы, но содержится РНК-зависимая РНК-полимераза. Последняя синтезирует на минус-нити РНК комплементарные плюс-нити иРНК.

Таким образом, у каждой из перечисленных групп вирусов в механизме репликации их РНК имеются свои особенности, касающиеся количества молекул минус-РНК в геноме вирусов, порядка трансляции генов, локализации формирования вирусных нуклеокапсидов и вирусных частиц в клетке, роли в этих процессах клеточных мембран.

Репликация двуспиральных вирусных РНК. Двуспиральные РНК содержат реовирусы, вирусы раневых опухолей растений. В составе вириона содержится РНК-зависимая РНК-полимераза. Репликация происходит следующим образом: на минус-нити геномной двуспиральной РНК синтезируется односпиральная плюс-нить, которая содержит сайт связывания с рибосомой и сайт связывания с РНК-зависимой РНК-полимеразой, кодируемой вирусным геномом. Эти односпиральные (плюс-нитей) РНК служат вначале матрицей для синтеза вирусных белков, в том числе и упомянутой полимеразы. После синтеза последней она связывается с этими же плюс-нитевыми РНК и синтезирует на их матрице минус-нить РНК.

Вирусные двуспиральные РНК не могут поступать в рибосомы непосредственно. Заключение в них генетическая информация может передаваться на рибосомы опосредованно, т. е. через односпиральные иРНК, поскольку в клетке нет вирусспецифического фермента, который синтезировал бы односпиральную иРНК на матрице двуспиральной вирусной РНК, а также нет фермента, который катализировал бы репликацию самой двуспиральной вирусной РНК. Фермент, синтезирующий односпиральную иРНК на матрице

двуспиральной вирусной РНК, — РНК-транскриптаза - находится в самих вирионах. Роль РНК-транскриптазы сводится к переписыванию генетической информации с двуспиральных вирусных РНК на односпиральные иРНК.

Репликация онкорнавирусов. Сведения о механизме репродукции онкорнавирусов получены на модели вируса саркомы Рауса. Процесс репликации онкорнавирусов сопряжен с синтезом ДНК.

Для осуществления синтеза ДНК на матрице РНК необходимо наличие в зараженных клетках специфического фермента — РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы), который содержится в составе вирионов. Кроме того, в составе вирионов обнаружена ДНК-зависимая ДНК-полимераза, которая осуществляет синтез ДНК на матрице ДНК.

Общая схема репродукции онкорнавирусов представляется в следующем виде.

Образование вирусспецифической ДНК начинается на вирусной РНК, причем синтез осуществляется при помощи фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы. В результате образуется гибридная двуспиральная молекула, одна нить которой РНК, вторая — ДНК. Далее, происходит избирательное отщепление нити РНК-гибридной молекулы при помощи фермента рибонуклеазы Н.

На односпиральной молекуле ДНК, оставшейся после разрушения РНК, синтезируется комплементарная нить ДНК, в результате чего образуется двуспиральная ДНК. Эта реакция осуществляется той же полимеразой, которая принимает участие в образовании первой нити ДНК. Затем двуспиральная ДНК встраивается в клеточную хромосому, при помощи различных ферментов.

Вирусспецифическая ДНК, встроенная в клеточный геном, транскрибируется с образованием вирусной РНК, которая вначале выполняет функции иРНК, направляя синтез вирусспецифических белков, а затем соединяется с ними и, формируя новое поколение вирионов. На этом цикл репродукции онкорнавирусов завершается.

#### **4.3.4 Синтез вирусных белков**

В основе этого синтеза лежит тот же механизм, что и при синтезе белка в нормальных клетках. У РНК-содержащих пикорнавирусов функцию иРНК выполняют плюс-нити. У них односпиральная вирионная РНК транслируется с образованием одного гигантского полипептида, который затем расщепляется на отдельные функциональные белки.

Вирусные белки в процессе инфекции синтезируются в избыточном количестве, чем требуется для образования инфекционного вируса.

У большинства вирусов синтез белков осуществляется в цитоплазме. На разных стадиях инфекционного цикла могут преимущественно образовываться то одни, то другие

группы вирусспецифических белков. Скорость их регулируется либо на уровне транскрипции (с образованием иРНК), либо на уровне трансляции (считывание иРНК на рибосомах).

Синтез вирусных нуклеиновых кислот и вирусспецифических белков происходит почти одновременно и не менее чем на 1 ч опережает созревание вирусных частиц.

#### **4.3.5 Сборка вирионов**

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. Вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме, называют цитоплазматическими. Однако это разделение весьма относительно, по тому 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.

В основе самосборки лежит специфическое белок-нуклеиновое и белок-белковое узнавание, которое может происходить в результате гидрофобных ионных и водородных связей.

Объединение белка с вирусными нуклеиновыми кислотами в клетке происходит спонтанно как чисто физико-химическая реакция агрегации, требующая участия дополнительных факторов (рН, ионной силы, ионов металлов, осмоса и т. п.). После того как концентрация вирусных РНК и белка достигает критического уровня, у сложно устроенных вирусов принципы самосборки обеспечивает от начала до конца морфогенез вирионов.

Образование нуклеокапсидов. Быстрое включение РНК в капсид обусловлено сравнительно быстрым и в избытке накоплением в зараженной клетке структурных белков нуклеокапсидов. Формирование (ассемблирование) вирионов происходит путем самосборки, которая обусловлена «узнаванием» РНК белками.

Нуклеокапсиды накапливаются в цитоплазме зараженных клеток, причем скорость образования внутриклеточных нуклеокапсидов гораздо выше, чем скорость образования вируса. Образование внутриклеточных нуклеокапсидов сопряжено во времени с биосинтезом 50S РНК.

Организация вирусной мембраны. Структурной основой вирусных и цитоплазматических мембран является двойной липидный слой. Последний у вирусной мембраны почти без изменений повторяет липидный слой плазматической мембраны клетки-хозяина.

Главная роль в организации липопротеидной мембраны вируса, равно как и во

включении нуклеокапсида в участок почкования, видимо, принадлежит белку М.

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. 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.

Все вирусные компоненты — нуклеокапсиды и суперкапсидные белки — прибывают к месту сборки независимо друг от друга.

Включение гликопротеидов в определенные зоны клеточных мембран приводит к модификациям мембран. Нуклеокапсид узнает эти участки и подходит к ним с внутренней стороны липидного бислоя.

Сборка ДНК-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.

Сборка ядерных вирусов начинается в ядре, обычно — в ассоциации с ядерной мембраной.

У непочкующихся липидосодержащих вирусов (вирусов оспы) сборка вирионов происходит в уже описанных цитоплазматических «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.

#### **4.3.6 Выход вирусных частиц из клетки**

Существует два способа выхода вирусного потомства из клетки: путем взрыва и путем почкования. Выход из клетки путем взрыва связан с деструкцией клетки, наруше-

нием ее целостности, в результате чего находящиеся внутри клетки зрелые вирусные частицы оказываются в окружающей среде. Однако некоторые из этих вирусов могут транспортироваться на клеточную поверхность до гибели клетки.

Выход из клетки 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.

## **5. Взаимодействие вируса с клеткой**

### **5.1. Типы взаимодействия вируса с клеткой**

Имеются два основных типа взаимодействия вируса и клетки. При первом типе вирусный геном функционирует в зараженной клетке более или менее автономно. Репродукция его происходит независимо от репродукции клеточного генома. Вирусы, автономно размножающиеся в клетке, относятся к группе вирулентных. При таком характере взаимодействия вируса и клетки образуется новое поколение вирионов. В этом случае говорят о продуктивном взаимодействии. Когда же цикл репродукции прерывается на какой-либо промежуточной стадии и инфекционного вирусного потомства не образуется, такое взаимодействие вируса и клетки называют абортным (лат. *abortus* – выкидыш). В тех случаях, когда симбиоз клеточного и вирусного геномов оказывается кратковременным и после образования нового поколения вирусных частиц зараженная клетка (клетка-хозяин) гибнет, такую реакцию на вирусную инфекцию называют литической (лат. *lysis* - растворение). Явление, когда клетка, в которой автономно размножается вирус, длительно сохраняет свою жизнеспособность, получило название латенции (лат. *latens* – скрытый).

Второй тип взаимодействия вируса и клетки свойствен опухолевым вирусам, нуклеиновая кислота которых способна встраиваться (интегрироваться) тем или иным образом в клеточную хромосому в форме провируса, вызывая трансформацию клеток. Границы между вирусами с автономной репликацией геномов и интеграционными вирусами весьма условны, и один и тот же вирус в зависимости от вида клеток может вести себя либо как инфекционный, либо как интеграционный геном. Результатом такого взаимодействия вируса и клетки является изменение наследственных свойств клетки. Этот тип взаимодействия вируса и клетки называют вирогенией, подобно лизогении при взаимодействии фагов с бактериями. Вирусы, способные вызывать вирогению, относят к группе умеренных.

### **5.2 Реакция клетки на вирусную инфекцию**

Разные вирусы могут вызывать самые разнообразные клеточные реакции, связанные с изменениями обмена и функции клетки. Клеточные реакции на вирусную инфекцию

могут быть четырех типов.

К первому из них относятся разнообразные патологические изменения, проявляющиеся угнетением синтетических процессов, нарушением функциональной активности, повреждением структуры самой клетки и ее гибелью. Такие изменения обозначаются как цитопатическая реакция (цитопатическая – клетка + патос-страдание) на вирусную инфекцию, а способность вирусов вызывать такую реакцию — как цитопатогенное действие.

Второй тип клеточных реакций заключается в синтезе закодированных в клеточном геноме белков (интерферонов), обладающих антивирусной активностью.

Третий тип реакции проявляется размножением вируса без видимых патологических изменений клеток (латенция).

И, наконец, возможен четвертый тип, когда наличие, вируса в клетке сопровождается ее пролиферацией.

Клетка гибнет под влиянием вирусной инфекции от ряда независимых друг от друга причин: 1) неспецифической необратимой блокировки клеточного генома на ранних стадиях инфекции; 2) неспецифических повреждений клеточного генома в процессе инфекции; 3) переключения метаболических ресурсов клетки на вирусспецифические синтезы; 4) специфического лизиса клетки при освобождении созревших вирионов в среду; 5) нарушения структуры клеточных мембран в результате интенсивного выхода вирусных частиц в среду.

Заражение клетки, как правило, сопровождается угнетением синтеза основных клеточных макромолекул — ДНК, РНК и белков. Однако угнетение образования этих трех классов соединений наступает не одновременно, а иногда избирательно. Самое распространенное функциональное нарушение зараженной клетки — это утрата способности ее к делению (угнетение митоза). По типу действия на митотическую активность клеток вирусы можно разделить на три группы: 1) стимулирующие митоз, 2) ингибирующие митоз и 3) не оказывающие влияния на митотическую активность.

Большинство миксовирусов подавляет митоз (паротит, корь). Показана зависимость репродукции вирусов от стадии митоза, в которой находятся клетки.

### **5.3 Влияние вирусов на хромосомный аппарат клетки**

При заражении вирусами клеток возникают изменения хромосом по крайней мере трех видов: отдельные разрывы, пульверизация хромосом, нарушение правильной ориентации клеточного веретена.

Известны два способа образования патологических изменений в клетке, зараженной вирусом. По первому из них цитопатогенное действие может вызывать тот или иной структурный компонент инфицирующего вириона; при этом совершенно не обязательно,

чтобы геном вируса проник в клетку. Такой способ действия вирусов называют цитопатогенным действием *извне*.

Если же действие вируса связано с попаданием вирусного генома в пораженную клетку и образованием некоторых продуктов, которые и являются первой причиной развивающейся патологии, то такое действие называют цитопатогенным действием *изнутри*.

Примером цитопатогенного действия *извне* является лизис *извне* — разрушение бактериальной клетки под влиянием бактериофага. Он может происходить и при обработке клеток теньями фагов, лишенными ДНК. При большой множественности заражения повреждается значительная доля клеточной поверхности и быстрое восстановление невозможно, из клетки выходят многие ферменты и другие жизненно важные компоненты. Считают, что в механизме возникновения лизиса *извне* какую-то роль играет лизоцим, находящийся в отростке фаговой частицы.

Некоторые вирусы, имеющие наружную липопротеиновую мембрану, на ранних стадиях взаимодействия с клеткой индуцируют образование симпластов, или поликариоцитов, — слияние клеток в комплексы, содержащие два или несколько ядер. Симпластообразование — результат слияния, при котором происходит образование многоядерных клеток путем обобществления цитоплазмы клеток-соседей. Возникающие поликарионы могут содержать до 100 ядер. Для образования поликарионов требуется довольно большая множественность заражения (около 1000 вирионов на клетку), определенный солевой состав среды, в частности обязательное присутствие  $Ca^{++}$ , и тепло. Интенсивность слияния зависит и от физиологического состояния клеток.

Описано два вида слияния: *извне* и *изнутри*. Для слияния *извне* не обязательна интактность (неповрежденность) вирусных частиц, так как активны и неинфекционные частицы, полученные путем обработки вируса ультразвуком или УФ-лучами. Более того, слияние *извне* могут индуцировать отдельные компоненты вируса. Для слияния *извне* не требуется клеточного синтеза. Симпласт образуется при использовании большой заражающей дозы, например свыше 1000 вирусных частиц на клетку. Считают, что образование симпластов происходит в результате повреждения клеточных мембран при взаимодействии с липопротеидными оболочками вириона.

Для слияния *изнутри* необходимы заражение инфекционным вирусом, более длительная инкубация зараженных клеток, синтеза РНК и белков зараженных клеток при относительно низкой множественности заражения. Слияние *извне* индуцируется материалом заражающего вируса, а слияние *изнутри* — продуктами репликации вируса в клетке. Оба вида слияния существенно зависят от вида клеток и штамма-вируса.

Образование симпластов происходит в несколько стадий (рис. 39). Сначала вирус

вызывает агглютинацию клеток, образуя как бы мостик между двумя клеточными мембранами. Затем мембраны двух соседних клеток, расположенных вблизи вирионов, приходят в тесный контакт друг с другом. Далее (при наличии оптимальных условий) клеточные мембраны разрушаются в том месте, где они контактируют с вирионом. В результате образуется сообщение между двумя соседними клетками. Вблизи разорвавшегося отверстия разорванные мембраны соседних клеток соединяются между собой, образуя цитоплазматические мостики между клетками. Эти мостики расширяются, и, наконец, соседние клетки полностью сливаются.

Пример. Под влиянием вирусной инфекции *in vitro* могут сливаться не только одинаковые, но и разные клетки одного и того же вида, а также клетки разных видов и даже классов животных. Образовавшиеся при этом «гибридные» клетки получили название гетерокарионов. Поскольку последние могут быть жизнеспособными в течение длительного времени, их используют для разнообразных цитологических, биохимических и генетических исследований.

Помимо симпластов, вирусы могут индуцировать в зараженных клетках образование включений. Вирусные включения представляют собой видимые под микроскопом массы, содержащие скопления либо вирусных частиц (вирусы группы оспы), либо предшественников вируса (белков или нуклеиновых кислот), либо измененных клеточных компонентов. В зависимости от состава эти массы могут окрашиваться разными красителями. Вирусные включения имеют разнообразную, но характерную для данного вируса локализацию в клетке. Они могут являться важным, а иногда единственным признаком вирусной инфекции.

Таким образом, патологические нарушения структуры и функции инфицированной клетки могут быть весьма разнообразны. В развитии клеточных повреждений на поздних стадиях инфекции играют роль не только вирусспецифические, но и клеточные белки — ферменты. Так, в результате повреждения мембран из лизосом клетки могут выходить в цитоплазму такие гидролитические ферменты, как ДНК-аза, РНК-аза, фосфатаза, протеазы и др.

Со смертью клетки прекращается и репродукция вируса, однако вирусы, не обладающие цитопатогенным действием, могут репродуцироваться без гибели клетки, т. е. ЦПД — необязательная предпосылка продуктивного взаимодействия вируса и клетки.

Имеется и другой тип повреждений наружных мембран клеток при парамиксовирусной инфекции; он состоит в нарушении проницаемости их для разных веществ. В зараженных вирусом клетках могут наблюдаться и защитные реакции, направленные на борьбу с инфекционным началом. Наиболее важной реакцией является образование ин-

терферона, добавление которого к незараженным клеткам предотвращает развитие инфекционного процесса.

Таким образом, варианты ответов клетки-хозяина на вирусную инфекцию разнообразны. Для некоторых систем вирус-клетка характерны цитопатогенное действие и гибель зараженных клеток. В других системах клетки никак внешне не реагируют на инфекцию: они сохраняют морфологию, биохимическую характеристику и способность делиться. Между тем и такое состояние сопровождается продукцией инфекционного потомства или его отдельных компонентов. В некоторых случаях заражение парамиксовирусами приводит к усилению клеточной активности.

## **6. ГЕНЕТИКА ВИРУСОВ**

В соматических клетках каждого биологического вида имеется строго определенный набор хромосом. Каждая хромосома является парной. Набор хромосом двойной (диплоидный), а в зрелых половых клетках единичный (гаплоидный). При митозе происходит удвоение хромосом и равное распределение их между клетками.

### **6.1 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, является усилитель транскрипции (enhancer) и промотор – область ДНК, находящаяся непосредственно перед структурными генами со стороны 3'-конца цепи.

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.

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 сшивание экзонов называется сплайсинг (от англ. слова splice – соединять, сращивать концы каната).

В геноме эукариотов наряду с уникальными обнаружены короткие и более длин-

ные повторяющиеся нуклеотидные последовательности, которые обладают способностью перемещаться по геному, они называются «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 свидетельствует о его гибкости и пластичности, не исключающих создание новых генов и генных семейств.

## **6.2 Структурная организация генома вируса**

У вирусов роль хромосом выполняет нить нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), у одних она цельная, у других (грипп, рео-ареновирус) – фрагментированная. Отдельные участки нуклеиновой кислоты, ответственные (детерминирующие) за синтез определенного белка, получили название генов. Простейшие из известных вирусов содержат от трех до пяти генов (например, ДНК-содержащий вирус полиомы; у пикорнавирусов 6—8 генов). Однако у более сложного вируса (например, крупного бактериофага Т4) более 30 генов контролируют синтез белков оболочки и не менее 15 — синтез нуклеотидных предшественников; для размножения этого фага требуется участие примерно сотни генов.

Ген не является неделимым. У него имеются более мелкие участки (мутоны, реконы), несущие определенные функции. Как известно, ген является носителем одновременно трех свойств:

- 1) контролирует тот или иной признак организма (функция),
- 2) обменивается в скрещиваниях (рекомбинация) и
- 3) изменяется (мутация).

Понятие цистрон соответствует понятию ген - единице функции, т. е. соответствует информации об одном белке.

Синтез ферментов у вирусов закодирован в генах. Любой фермент (белок) может синтезироваться только в том случае, если в нуклеиновой кислоте имеется соответствующий ген, кодирующий синтез данного фермента. Последовательность работы цистронов определяется индукцией или репрессией.

Под геномом вируса понимают совокупность всех генов данного вируса. У одних вирусов геном образован одной молекулой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), у других — несколькими молекулами (вирусы гриппа, рео- и ареновирусы).

Фенотип — это совокупность всех внешних и внутренних признаков и функции данного вируса. Генотип же определяется только структурой наследственного материала — ДНК или РНК, т. е. последовательностью нуклеотидов в их молекулах или кодом белкового синтеза. Фенотип вируса не является его постоянным свойством. Генотип же — это постоянное свойство вируса, и меняется он в результате мутаций, происходящих в-

геноме. Мутационные изменения в геноме вируса влекут за собой и изменения его фенотипа.

Способы 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 полипептидов.

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

Способами увеличения информации являются:

1) двукратное считывание одной и той же иРНК, но с другого иницирующего кодона;

В составе иРНК обычно встречается несколько иницирующих кодонов. 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 последующего 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 разной длины. Такие иРНК имеются у многих вирусов.

2) сдвиг рамки трансляции;

Трансляция может происходить без сдвига рамки и со сдвигом ее. 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, при трансляции с двух разных иницирующих кодонов будут синтезироваться полипептиды, представляющие собой укороченный участок первого полипептида (трансляция без сдвига рамки).

В том случае, если произошел сдвиг на один или два нуклеотида, меняется смысл всех кодонов (триплетов), стоящих за местом сдвига. В этом случае одна молекула иРНК может транслироваться с образованием двух уникальных белков, т.е. таких, у которых нет идентичных аминокислотных последовательностей.

Таким образом, общее число триплетов в составе молекулы нуклеиновой кислоты может быть меньше суммы числа триплетов, входящих в состав всех генов. Более точные представления о числе генов можно получить путем биохимического и генетического анализов.

4) сплайсинг;

5) сплайсинг со сдвигом рамки широко распространен у ряда вирусов. В результате сплайсинга и сдвига рамки иРНК генов транслируются с образованием двух белков

Одним из способов экономии генетического материала является нарезание полипептида - предшественника на участки разной длины, в результате чего образуются разные полипептиды с перекрывающимся аминокислотными последовательностями.

4)транскрипция с перекрывающихся областей ДНК и и др.

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

### **6.3 Наследственность у вирусов**

Наследственность — это свойство организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями, а также обуславливать специфический характер индивидуального развития. Изменчивость — свойство, противоположное наследственности. Изменчивость вирусов может быть обусловлена мутацией генов.

### **6.4 Мутации у вирусов**

В основе наследственного изменения свойств вирусов могут лежать два процесса:

1) мутация, т. е. изменение последовательности нуклеотидов в определенном участке генома вируса, ведущее к фенотипически выраженному изменению свойства, и

2) рекомбинация, т. е. обмен генетическим материалом между двумя близкими, но отличающимися по наследственным свойствам вирусами.

Мутация — изменчивость, связанная с изменением самих генов. Она может иметь прерывистый, скачкообразный характер и приводит к стойким изменениям наследственных свойств вирусов.

Все мутации вирусов делятся на две группы:

- спонтанные и
- индуцированные;

По протяженности их делят на:

- точечные и
- абберационные (изменения, затрагивающие значительный участок генома).

Точечные мутации обусловлены заменой одного нуклеотида (для РНК-содержащих вирусов) или одной пары комплементарных нуклеотидов (для ДНК-содержащих вирусов). Такие мутации могут иногда ревертировать с восстановлением исходной структуры генома.

Однако мутационные изменения способны захватывать и более крупные участки молекул нуклеиновых кислот, т. е. несколько нуклеотидов. В этом случае тоже могут происходить выпадения, вставки и перемещения (транслокации) целых участков и даже повороты участков на  $180^\circ$  (так называемые инверсии). Это будут уже более крупные перестройки в структуре нуклеиновых кислот, а следовательно, и нарушения генетической информации.

Следует отметить, что не всегда точечные мутации реализуются. Имеется ряд причин, в силу которых такие мутации могут не проявляться. Одна из них — вырожденность генетического кода. Как уже указывалось, код белкового синтеза вырожден, т. е. некоторые аминокислоты могут кодироваться несколькими триплетами (кодонами). Например, аминокислота лейцин может кодироваться шестью триплетами. Вот почему если в молекуле РНК вследствие каких-то воздействий произошла замена триплета ЦУУ на ЦУЦ, ЦУА на ЦУГ, то в молекуле синтезируемого белка все равно включится аминокислота лейцин. Поэтому ни структура белка, ни его биологические свойства не нарушатся.

Другое дело, когда какая-то аминокислота кодируется всего одним триплетом, например, синтез триптофана кодируется только одним триплетом УГГ и замены, т. е. синонима, не имеет. В этом случае в белок включается какая-нибудь иная аминокислота, что может привести к появлению мутантного признака.

Как спонтанные, так и индуцированные мутации делят также на прямые и обратные (реверсии). Прямые мутации меняют фенотип, а обратные его восстанавливают.

#### **6.4.1 Спонтанные мутации**

Спонтанные мутации у вирусов возникают в популяции без искусственного вмешательства со стороны экспериментатора. Не может быть абсолютно однородных популяций. Однородность относительна, поэтому в вирусной популяции в процессе ее развития спонтанные мутанты возникают с определенной вероятностью.

Частота мутаций одного и того же признака может быть различной в зависимости

от штамма. Так, частота мутаций по признаку  $rst\ 40^\circ$  у штамма W-Fox вируса полиомиелита составляла  $2,4 \times 10^{-5}$ , тогда как у штамма Ch-AT она была на порядок ниже —  $2,0 \times 10^{-6}$ .

Каковы причины и механизмы возникновения спонтанных мутаций? По мнению Уотсона и Крика, спонтанные мутации могут возникать вследствие таутомерного (таутомерия – один из видов изомерии, при которой изомеры легко переходят друг в друга) превращения оснований, входящих в состав ДНК. Так, например, таутомерный сдвиг в положении атома водорода у аденина приводит к тому, что аденин при репликации спаривается не с тиминном, а с гуанином. Такая ошибка при спаривании оснований приводит при последующих репликациях к замене пары АТ и ГЦ.

Спонтанные мутации, возникшие в одном и том же гене, распределяются по его длине неравномерно. Одни участки гена мутируют часто, их называют «горячими» точками, другие же — редко. Кроме того, спонтанные мутации при репликации могут быть обусловлены ошибками в работе ферментов — ДНК- или РНК-полимераз.

Изучение мутационной изменчивости того или иного вируса состоит в определении физико-химических и биологических свойств мутанта. (вирулентностью, реактогенностью, иммуногенностью, способность репродукции в той или иной системе, терморезистентность, гемагглютинирующие, гемолизирующие и другие свойства).

Мутации у вирусов могут возникать и в результате адаптации их к необычным биологическим системам *in vitro* (культуры клеток) и *in vivo* (животные, куриные эмбрионы).

Мутации при пассажах на животных. Стабильные высокоиммуногенные штаммы вирусов получают методом длительной адаптации к лабораторным, естественно-восприимчивым или невосприимчивым животным. Так, был получен вакцинный штамм (*virus fixe*) бешенства.

При адаптации вирусов к естественно-невосприимчивым видам животных или к гетерогенным тканям экспериментально-восприимчивых животных решающее значение имеют вид и возраст животного, способ введения вируса и его свойства, а также свойства штамма.

Для успеха адаптации вирусов к организму лабораторных животных существенное значение имеет ослабление резистентное их путем воздействия кортизоном, температурой, облучением  $\gamma$ -лучами и т. п.

Мутации при пассажах в культурах клеток. В культурах клеток и тканей успешно выращиваются и аттенуируются многие вирусы.

Причины возникновения мутаций в процессе адаптации. Изменение свойств вируса в процессе пассажей происходит ступенчато. В первых пассажах обнаруживают главным

образом вирионы, изменившие какой-либо один генетический признак; с увеличением пассажей в популяции выявляют вирионы, изменившие два и более генетических признака; по мере пассирования количество таких частиц постоянно возрастает, и в дальнейшем у подавляющего большинства вирусных частиц наблюдают изменение многих генетических признаков.

В основе механизма наследственной изменчивости вирусной популяции при пассажах лежат два процесса: мутация и селекция, причем и в том, и в другом процессе важную роль играет внешняя среда, являющаяся одновременно индуктором мутации и селективным фактором.

Если гетерогенную вирусную популяцию, имеющую в своем составе измененные и исходные вирусные частицы, культивировать в обычных условиях, то это приводит к ее реверсии.

Наконец, накопилось большое число фактов об изменчивости вируса, вызываемой хозяином (*host-controlled variation*). Эти изменения заключаются в том, что клетка влияет на характер синтезируемых в ней компонентов вируса. Такие модификации не затрагивают нуклеотидную последовательность вирусного генома.

Таким образом, клетка хозяина может существенно влиять на фенотип вируса или блокировать (частично или полностью) его репродукцию.

#### **6.4.2 Индуцированные мутации**

Возникают при действии на вирус (на его вегетативную или покоящуюся форму) различными химическими и физическими мутагенами, а также в процессе адаптации его к необычным биологическим системам (при адаптационной изменчивости).

Применение искусственных мутагенов имеет два преимущества. Во-первых, они вызывают мутации в десятки и сотни раз эффективнее, чем природные факторы, и, во-вторых, действие некоторых искусственных мутагенов имеет известную направленность, что позволяет заранее предвидеть, на какие элементы структуры нуклеиновых кислот и каким образом действует тот или иной мутаген и какие изменения в них вызовет.

Химические мутагены. Предложено разделить мутагены на две основные группы:

1) мутагены, реагирующие с нуклеиновой кислотой только во время ее репликации (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований);

2) мутагены вступающие в реакцию с покоящейся молекулой нуклеиновой кислоты, но требующие для формирования мутаций последующих ее репликаций (азотистая кислота, гидроксилламин, алкилирующие соединения).

В последние годы синтезирован и изучен целый ряд химических соединений — супермутагенов (нитрозопроизводных мочевины — нитрозогуанидин и его производные)

Молекулярные механизмы мутагенного действия химических соединений. В основе молекулярных изменений вирусной нуклеиновой кислоты, приводящих к мутации, лежат два основных процесса — замена основания и выпадение или вставка основания. Различают два типа замены оснований, входящих в состав вирусной нуклеиновой кислоты: простую (транзиция) и сложную (трансверсия). При простой замене на место одного пуринового основания встает другое (например, вместо аденина — гуанин) или вместо одного пиримидинового основания — другое пиримидиновое основание (вместо цитозина — урацил).

При сложной замене — трансверсии вместо пуринового основания появляется пиримидиновое или пиримидиновое основание заменяется пуриновым.

Другой процесс — выпадение (делеция) или вставка оснований — ведет к более глубоким изменениям генетического кода, чем простая — замена оснований. Мутационные повреждения в одном участке генома нередко приводят к изменению нескольких генетических признаков, имеющих различное фенотипическое проявление (плейотропия).

Мутагенное действие аналогов азотистых оснований (5-бромурацила, 5-фторурацила, 5-йодурацила, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина). Аналоги оснований индуцируют мутации только при воздействии на реплицирующиеся молекулы ДНК и РНК. Из этой группы соединений наиболее хорошо изучены 5-бромурацил и 2-аминопурин. Тимин (Т) является урацилом (У), в котором атом водорода (Н) в одной из СН - групп заменен метильной группой (СН<sub>3</sub>). Другими словами, тимин — это метилурацил. Однако в урациле этот атом водорода можно заменить и другим атомом, например брома (Br). В результате такой замены получается новое соединение — бромурацил (БУ), который является аналогом тимина, так как структура основного ядра (кольца) у обоих соединений совершенно одинакова, а различие заключается лишь в одной группе (Br вместо СН<sub>3</sub>).

Мутации, индуцируемые алкилирующими соединениями. К веществам, под действием которых основания удаляются из нуклеиновой кислоты, относятся алкилирующие соединения — иприт и его аналоги, этиленимин и его аналоги - этилметансульфонат и этилэтансульфонат и др. Они непосредственно взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, пуринами и главным образом с гуанином, вызывая простые (транзиции) и сложные (трансверсии) замены; из ДНК удаляются пурины (в основном гуанин) и, в зависимости от того, какой нуклеотид встретится напротив бреши при репликации, либо возникает мутация типа замены, либо не возникает ее совсем.

Кроме простых замен (пурин на пурин), алкилирующие агенты способны индуцировать сложные замены — пурин на пиримидин.

Мутагенное действие гидроксиламина. Гидроксиламин индуцирует мутации по ти-

пу образования простых замен оснований в нуклеиновой кислоте, направление которых зависит от типа нуклеиновой кислоты, которую содержит вирус. У ДНК-содержащих вирусов этот мутаген реагирует исключительно с цитозином. При воздействии на РНК-содержащие вирусы он вступает в реакцию как с цитозином, так и с урацилом, что обуславливает замены цитозина на урацил и наоборот.

Мутагенное действие азотистой кислоты. Среди веществ, химически изменяющих основания в покоящейся молекуле нуклеиновой кислоты, наиболее хорошо изучены азотистая кислота и гидросиламин. Механизм действия азотистой кислоты ( $\text{HNO}_2$ ) как мутагена на нуклеиновые кислоты вирусов заключается в дезаминировании органических оснований, т. е. отщеплении от их молекул аминогруппы ( $\text{NH}_2$ ). В результате действия азотистой кислоты аденин (А) превращается в гипоксантин (Гк), гуанин (Г) — в ксантин (К), а цитозин (Ц) — в урацил (У). Вследствие этой реакции у дезаминированных органических оснований возникают новые свойства.

Мутагенное действие повышенной температуры. Влияние повышенной температуры ( $40\text{—}50\text{ }^\circ\text{C}$ ) обнаружил Фриз в опытах с фагом Т4 и Ю. 3. Гендон при обработке РНК вируса полиомиелита. Температура способствует удалению пуринов (преимущественно гуанина) из ДНК. При репликации такой ДНК напротив брешки, вызванной утратой пурина могут быть включены в реплицирующую нить любые нуклеотиды. Если включится новый тип основания, которого ранее в этом участке не было, может произойти мутация (транзиция или трансверсия).

Мутагенное действие ультрафиолетовых лучей. Действие ультрафиолетовых лучей (УФ) как мутагенов состоит в том, что они взаимодействуют с молекулами нуклеиновых кислот и поглощаются ими, особенно лучи с длиной волны  $260\text{—}280$  нм. Попадая в молекулу нуклеиновой кислоты, они поглощаются входящими в ее состав органическими основаниями. Оказалось, что тимин (Т), урацил (У) и цитозин-(Ц) более чувствительны к ультрафиолетовым лучам, чем аденин (А) и гуанин (Г). В результате облучения структура указанных пиримидинов изменяется. При облучении УФ-лучами две соседние, молекулы тимина соединяются друг с другом в пары, образуя так называемые димеры.

### **6.5 Репарации**

Установлено, что в клетках организмов имеются своего рода корректоры, ими являются так называемые репарирующие ферменты, задача которых состоит в выправлении ошибок в генетической информации, исправлении отдельных повреждений в структуре нуклеиновых кислот. Репарирующие ферменты для исправления ошибок и повреждений в структуре нуклеиновых кислот используют очень тонкие приемы «восстановительной микрохирургии». Они распознают каким-то образом в молекулах нуклеиновых кислот

аномальные кодоны и повреждённые участки и стараются их по возможности быстро исправить. Любую ошибку в генетической информации репарирующие ферменты стремятся исправить до начала репликации нуклеиновых кислот, так как в противном случае эта ошибка при матричном механизме копирования перейдет к дочерним молекулам нуклеиновых кислот, передастся потомству и станет наследственной.

Один из ферментов, участвующих в восстановлении первичной структуры ДНК (эндонуклеаза), «отрезает» поврежденный нуклеотид от соседнего нуклеотида слева, а другой фермент — справа. Вырезанный аномальный нуклеотид (или участок молекулы) отбрасывается в окружающую среду. Затем приступает к работе другой фермент (экзонуклеаза), который расширяет брешь, образовавшуюся в нити ДНК. Далее фермент ДНК-полимеразы восстанавливает недостающие участки повреждений нити согласно закону комплементарности, т. е. в соответствии со второй нитью. На последнем этапе вновь синтезированные участки «сшиваются» в прочную единую цепь с помощью фермента лигазы, благодаря чему восстанавливается исходная молекула ДНК, не имеющая структурных изъянов.

### **6.6 Генетические и негенетические взаимодействия вирусов**

Как в естественных, так и в экспериментальных условиях одна клетка может быть заражена не одним, а несколькими вирусами. В процессе такой смешанной инфекции могут быть различные формы взаимодействия как между вирусными геномами, так и между продуктами генов. При взаимодействии геномов могут наблюдаться такие формы генетических воздействий, 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.

Рекомбинация. Возможен обмен как 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 и эксперименте штаммы микроорганизмов, в том числе вирусов, обладают характерными, легко регистрируемыми признаками, именуемыми генетическими маркерами. Например, были получены рекомбинанты между вирусами полиомиелита, обладающие повышенной устойчивостью и повышенной чувствительностью к гуанидину, разной нейровирулентностью, чувствительностью к ингибиторам сывороток животных и т. п. Для получения рекомбинантов используют штаммы, содержащие два или большее число маркеров.

Тест рекомбинации применяют для генетических исследований вирусов. С его по-

мощью возможно построение генетических карт вирусов, в которых определяется, в каких участках генома произошли мутации, а также в условных единицах измеряется расстояние между разными мутациями.

Рекомбинанты вирусов позвоночных удается получить только при скрещивании близких по свойствам вирусов, принадлежащих к одному роду. Частота возникновения их широко варьирует и существенно зависит от используемой биологической системы (клетки, вирус), а также от того, какое наследственное свойство стремятся рекомбинировать. Рекомбинация с высокой частотой наблюдается у РНК-содержащих вирусов (ортомиксо-, рео-, онкорнавирусов) и у всех ДНК-содержащих вирусов, геном которых представлен двуспиральной ДНК.

В экспериментальных условиях гибридные (рекомбинантные) формы можно получить одним из четырех способов:

1) при совместном культивировании двух жизнеспособных вирусов при введении их в организм или культуру клеток одновременно или в разное время;

2) если в чувствительную систему вводят живой и инактивированный (нагреванием или УФ-лучами) вирус;

3) при совместном культивировании вируса и вирусной нуклеиновой кислоты, выделенной из другого штамма;

4) в случаях одновременного введения в культуру клеток разных нуклеиновых кислот, соответствующих двум разновидностям вирусов.

Примером, характеризующим первый способ экспериментальной гибридизации, является опыт Бернета и сотр. по совместному культивированию в мозгу мышей нейротропного ( $N_{ws}$ ) и пневмотропного (MEL) штаммов вируса гриппа типа А, которые отличались между собой не только нейровирулентностью, но и антигенными и другими свойствами. В результате одновременной репродукции из популяции потомства удалось селекционировать методом предельных разведений гибриды, антигенно сходные с пневмотропным штаммом, но обладающие разной степенью нейровирулентности для мышей, заражаемых в мозг. Аналогичные гибридные формы возникают при одновременном культивировании этих же штаммов в куриных эмбрионах.

Более демонстративно гибридизация у вирусов проявляется при совместном культивировании инактивированного (УФ-лучами или прогреванием) и живого вируса гриппа. Гибриды совмещали признаки того и другого вируса, причем они могли возникать как при одновременном введении, так и в случаях раздельного введения вначале инактивированного, а вслед за ним (через 2—3 дня) живого вируса (рис. 1). При гибридизации инактивированного УФ-лучами вируса гриппа типа А, образующего бляшки на культуре куриных

фибробластов, с инфекционным вирусом гриппа того же типа, не обладавшим такой способностью, были получены бляшкообразующие рекомбинации. Введение инактивированного вируса, как правило, предшествовало заражению живым вирусом. В популяции первого поколения могут быть исходные штаммы вируса гриппа А и А2, а также гибриды с антигенными свойствами вируса гриппа А2 или полиантигенные варианты (АА2), резистентные к ингибиторам нормальной лошадиной сыворотки.

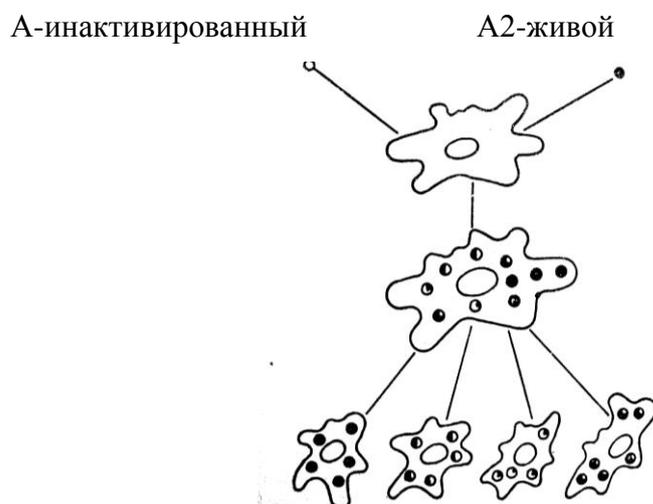


Рис. 1. Схема процессов рекомбинации вирусов гриппа при инфекции клеток инактивированным и живым вирусами.

Путем рекомбинации можно передавать ряд признаков; гем-агглютинирующую (склеивание и выпадение в осадок эритроцитов) активность, ингибиторе- и терморезистентность, патогенность для мышей, активность размножения в куриных эмбрионах, ферментативную, иммуногенную активность. Одни признаки (такие, как ингибиторорезистентность, гемагглютинирующая активность, инфекционность и иммунологическая активность) передаются регулярно, другие (терморезистентность, патогенность, ферментативная активность и ингибиторочувствительность) — нерегулярно.

При совместном культивировании инактивированного и живого вируса передача некоторых признаков носит коррелятивный характер, а именно -приобретение одного свойства влечет за собой одновременное появление другого. Так, вместе с приобретением ингибиторорезистентности наблюдалось значительное усиление активности размножения вируса в куриных эмбрионах и патогенности для белых мышей.

Установлена также возможность передачи ряда генетических признаков у вирусов гриппа человека как путем гибридизации вирусной РНК с инфекционным вирусом, так и путем гибридизации рибонуклеиновых кислот вирусов гриппа А и А2.

Между аденовирусами человека и паповавирусом обезьяны (SV40) удалось получить

недефектные гибриды. Доказана возможность возникновения рекомбинантов между вирусами гриппа животных и человека не только в опытах *in vitro*, но и в организме животных, что имеет прямое отношение к объяснению причин возникновения эпидемий гриппа. Рекомбинация наблюдалась у вирусов ящура и реовирусов. Доказана рекомбинация у вирусов полиомиелита типа 1 и ящура (между подтиповыми штаммами). Получен гибрид в результате рекомбинации между вирусами гриппа А—лошадиным 1/56 и человеческим А2. Рекомбинант содержал гемагглютинин лошадиного вируса и нейраминидазу человеческого штамма. Имеется много фактов, свидетельствующих о возможности рекомбинации вирусов гриппа в природе особым образом—обменом фрагментами.

В группе пикорнавирусов рекомбинация подробно исследовалась у вируса полиомиелита. У него недавно впервые построена количественная (аддитивная) генетическая карта ряда *ts*-мутантов (*ts* – маркер температурочувствительности). У данного вируса наблюдается группирование генов: два ранних гена локализуются по соседству, а поздние гены в другом районе карты.

Гибридизация ДНК-вирусов была впервые проведена с вирусами оспы кролика и осповакцины. Гибридизация лучше удается между близкими видами и разновидностями, чем между далекими видами, и совсем не удавалось получить гибриды при скрещивании оспенных вирусов с вирусами других семейств: герпеса, гриппа, полиомиелита, ящура и др.

Гибридизация (рекомбинация) свойственна всем вирусам, однако в ее обнаружении имеются определенные трудности. Она может быть обнаружена лишь в том случае, если два родительских вируса имеют различные легко выявляемые генетические маркеры. Для этой цели используют маркеры генетические (мутации), физические (родители имеют разную плотность или радиоактивность) и маркирование с помощью модификации, индуцированной хозяином.

Второе условие, необходимое для проведения рекомбинации и ее обнаружения,— обязательное проникновение в клетку обоих вирусов, участвующих в рекомбинации. Для этого используют высокие множественности заражения двумя родительскими типами, которые берут обычно в равных количествах. Конкретная методика проведения рекомбинации вирусов зависит в каждом случае от их типа. Длительность рекомбинации определяется длительностью цикла развития вируса, температурой (оптимальной температурой развития двух вирусных компонентов), выбором клеточной системы — возможностью одновременного развития в ней обоих вирусов без подавления механизмами клетки-хозяина и без влияния на потомство, что может исказить результаты рекомбинации.

Рекомбинация вирусов может быть причиной появления опухолевых антигенов Т.

Так, аденовирус типа 7, культивированный совместно с вирусом SV40, вызывает у новорожденных хомяков образование опухолей, в которых обнаруживаются два антигена Т, соответствующих двум указанным вирусам. Было высказано предположение, что между вирусами Ad7 и SV40 происходят генетические взаимодействия, в результате которых возникает гибридный штамм Ad7, обладающий свойствами обоих вирусов. Аналогичный феномен был установлен и у дефектного вируса саркомы Рауса (штамма Бриан). Этот вирус сам не может индуцировать синтез протеиновой оболочки и зависит от вируса-помощника одного из вирусов лейкоза птиц, который обеспечивает вирусный геном саркомы Рауса суперкапсидом.

За последние годы значительно расширились возможности внутривидовой и межвидовой рекомбинации вирусов. Установлена возможность наследственной передачи вирусу истинной чумы птиц (гриппа птиц А1) резистентное к амантадину путем межвидовой рекомбинации с устойчивым к этому агенту вирусом гриппа А0.

Виды и механизмы рекомбинации. Сейчас различают три вида рекомбинации.

Первый — общая рекомбинация, которая происходит между гомологичными последовательностями. Например, между геномами разных серотипов одного и того же вируса.

Второй — сайтспецифическая рекомбинация, которая происходит между молекулами нуклеиновых кислот, имеющих ограниченное структурное сходство, т. е. имеющими гомологичные последовательности только на коротких участках молекулы. Процессы интеграции одного генома в другой (например, интеграция ретровирусного генома в геном клетки, профага — в бактериальную хромосому, фага — в плазмиду, вирусного генома — в вирусный геном) можно рассматривать как частный случай рекомбинации этого типа.

Третий — незаконная рекомбинация, которая происходит между молекулами, не имеющими каких-либо сходных последовательностей нуклеотидов. Например, между геномами иридо- и поксвирусов.

Во всех трех случаях под рекомбинацией понимают симметричный или асимметричный обмен участками между молекулами нуклеиновых кислот.

Общая рекомбинация происходит обычно в процессе синтеза нуклеиновых кислот. При этом последовательность событий такова. Расплетаются цепи двух молекул нуклеиновых кислот — двуспиральной ДНК (или двуспиральной репликативной формы РНК). Происходит замыкание водородных связей между комплементарными последовательностями двух цепей, принадлежащих разным молекулам. Таким образом, формируется фигура рекомбинационного креста (структура Холидея). Зона замыкания водородных связей между цепями разных молекул называется гетеродуплексом. У *E. coli* с гетеродуплексом

связывается белок, именуемый RecA, который является полифункциональным ферментом. Он вовлечен в процесс рекомбинации и SOS-репарации.

RecA расплетает двойные спирали рекомбинирующих молекул и способствует гетероспариванию оснований, раздвигая таким образом структуру Холидея в обе стороны от места начала гетеродуплекса. Затем АТФ-зависимая эндонуклеаза, кодируемая генами *hcsB* и *hcsC*, вносит односпиральные разрывы, разделяя молекулы, обменявшиеся участками. Лигаза воссоединяет разрывы, и рекомбинировавшие молекулы расходятся. Такова модель рекомбинации, именуемая моделью Холидея, которая реализуется у вирусов эукариотов, нуклеиновые кислоты которых репродуцируются в клеточном ядре, фагов и бактерий. В этом случае происходит симметричный обмен фрагментами (например, одним и тем же геном).

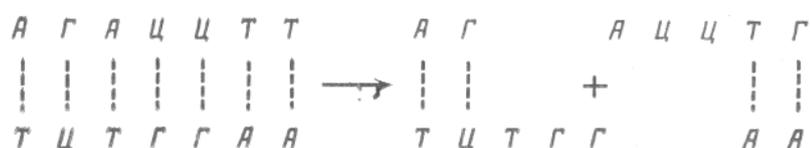
Однако обмен может быть и несимметричным. Такой обмен называют рекомбинацией по модели Мезельсона — Рэддинга. В этом случае процесс начинается с внесения эндонуклеазой односпирального разрыва в одну из рекомбинирующих молекул. Затем происходит разрыв водородных связей с 3'-конца от места односпирального разрыва, и таким образом формируется односпиральный фрагмент, 5'-конец которого свободен, а 3'-находится в составе одной из рекомбинирующих молекул, именуемой донорской молекулой. В молекуле второго партнера по рекомбинации происходит расплетание двойной спирали с образованием двух односпиральных петель. В зоне комплементарности происходит спаривание 5'-конца цепи одной из рекомбинирующих молекул с одной из односпиральных петель другой молекулы. Далее зона замыкания водородных связей в гетеродуплексе расширяется, затем односпиральный участок донорской молекулы разрезается нуклеазой, специфичной в отношении односпиральной нуклеиновой кислоты. В результате донорская молекула утрачивает участок одной из цепей нуклеиновой кислоты, который затем восстанавливается полимеразой на матрице второй цепи. Акцепторная молекула приобретает участок «чужой» молекулы, который находится в составе двойной спирали, а соответствующий «свой» участок связан с ней в виде односпиральной петли, которая гидролизуется нуклеазами. Процесс завершают лигазы, ликвидирующие в обеих молекулах односпиральные разрывы, и система репарации, «отыскивающая» и ликвидирующая неправильно спаренные нуклеотиды. В этом случае происходит асимметричный обмен фрагментами, в результате которого информация донорской молекулы входит в состав донорской и акцепторной молекулы, а информация акцепторной молекулы утрачивается. Такой механизм обнаружен пока только у эукариотических клеток и репродуцирующихся в них вирусов.

Сайтспецифическая рекомбинация изучена гораздо менее подробно. Практически

все данные о ней получены на примере транспозонов, ретрови-руссов и профагов. Известно, что при сайтспецифической рекомбинации обмен происходит асимметрично и начинается с зоны, содержащей два коротких взаимокomплементарных участка молекулы акцептора и молекулы донора. Причем в молекуле-акцепторе эти участки непосредственно соседствуют друг с другом, а в молекуле-доноре расположены на концах передаваемого в ходе рекомбинации участка. Процесс начинается с расплетания обеих молекул. Затем замыкаются водородные связи в зоне комплементарности. В результате образуется структура, состоящая из односпиральной петли молекулы-акцептора и соединенной с ней кольцевой петли участка молекулы-донора. Эта кольцевая петля может быть ковалентно замкнутой и включать весь геном, как это имеет место у профагов. Затем в петлю внутри сайта вносится односпиральный разрыв, и участок донорской молекулы оказывается соединенным с концами разрезанной молекулы-акцептора водородными связями. Односпиральные участки молекулы-акцептора спариваются водородными связями со второй цепью, а участок акцептора на ней образует петлю. На матрице этой петли полимеразы достраивают комплементарный участок, после чего акцепторная молекула, став двуспиральной, несет информацию молекулы-донора и, в отличие от случая в модели Мезельсона — Рэддинга, не утрачивает своих последовательностей нуклеотидов. Однако информация, кодируемая сайтом, и который произошла встройка, может утратиться или изменить смысл.

Незаконная рекомбинация происходит только при внесении в обе рекомбинирующие молекулы двуспиральных разрывов с последующим перекрестным замыканием этих разрывов. Ферментативные механизмы процесса изучены слабо, но можно предположить, что большую роль здесь играет действие эн-донуклеаз, разрезающих нуклеиновые кислоты с образованием липких концов (липкие концы образуются в результате разрезания двуспиральных молекул в разных точках каждой из цепей, отстоящих друг от друга на 3—5 нуклеотидов) .

Например:



Такие липкие концы склонны к самопроизвольному замыканию путем образования водородных связей, и, если замыкание произошло между липкими концами двух разных молекул, а оставшиеся односпиральные разрывы были ликвидированы лигазами, это будет означать, что произошла незаконная рекомбинация.

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 ее лежит кооперативный процесс, при котором вирионы с поражением разовых генов дополняют друг друга путем генетической рекомбинации, в результате чего репродуцируется исходный неповрежденный вирус.

Эффективность множественной реактивации зависит от многих причин: степени повреждения генома вирионов, числа проникших в клетку вирионов, концентрации 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.

При множественной реактивации помимо количества инактивированных

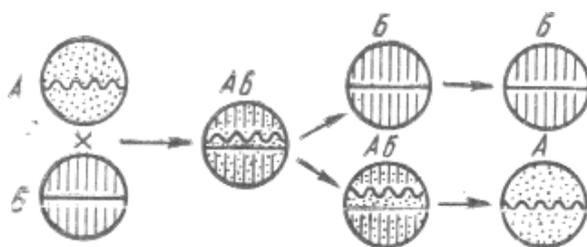


Рис. 2. Феномен множественной реактивация

вирусных геномов в клетке большое значение имеет характер культур клеток.

Пересортировка генов. Вариантом рекомбинации является феномен, получивший название пересортировки генов. Она наблюдается при генетических взаимодействиях между вирусами, имеющими сегментированный геном. Чаще всего это происходит с вирусами гриппа А (утка, человек). Образующиеся при этом гибридные формы вирусов называют реассортантами. Ре-ассортанты 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 (конstellляции, или созвездия) генов, которые в данной системе клеток более стойки, и данный вирус более жизнеспособен.

Сходные процессы пересортировки генов имеют место у вирусов гриппа типов А, В и С и у других вирусов с фрагментарным геномом у бунья-, арена- (односпиральные РНК) и реовирусов (ротавирусов) (двуспиральная РНК). Однако эти процессы не столь интенсивны и доступны изучению, как у вирусов гриппа.

Гетерозиготность. Это — феномен, заключающийся в том, что при одновременной репродукции, а клетке нескольких частиц вирусов, различающихся по наследственным

свойствам, могут образовываться вирионы, содержащие полный геном одного родительского штамма и, кроме того, часть генома (или полный геном) другого вируса (диплоидные или полиплоидные вирионы). Хотя такого рода объединение генетического материала в одной вирусной частице не наследуется, оно позволяет такому вириону дать потомство, в котором будет содержаться часть вирусных частиц со свойствами одного, а часть — другого родителя.

Вирусные частицы, дающие описанный феномен, получили название гетерозигот в отличие от обычных гомозиготных частиц, все потомство которых обладает одинаковыми свойствами. Механизм возникновения гетерозиготных штаммов изучен на бактериофагах.

Было показано, что в случае нагревания ДНК при температуре, близкой к 100°C, двойная ее спираль диссоциирует на две цепочки, которые при последующем медленном охлаждении могут вновь соединяться, и если в растворе присутствуют молекулы двух различных типов ДНК, то может произойти взаимообмен цепочками нуклеиновых кислот и образование смешанных молекул ДНК со свойствами, которые характерны для каждого из исходных вирусов. Как образуются гетерозиготные формы у вирусов, содержащих односпиральную РНК, не ясно.

Транскапсидация. Этот феномен наблюдается при одновременном выращивании в клетках аденовируса и обезьяньего вируса SV40. Неспособность аденовирусов человека самостоятельно размножаться в культуре клеток почки обезьяны объясняется незавершенностью последней стадии их репродукции. В инфицированных клетках обезьян аденовирус вызывает синтез иРНК, вирусспецифической ДНК и вирусспецифического опухолевого антигена, но не способен индуцировать синтез вирусных белков, из которых построен капсид аденовируса. В силу этого дефекта полноценный инфекционный аденовирус не формируется. При культивировании обоих вирусов, дефектных по репродукции в клетках обезьян, появляются вирионы с антигенными свойствами аденовирусов и вызывающие образование опухолей, в которых находят как антигены аденовируса А7, так и SV40. Такие гибриды — аденовирус, в капсиде которого содержится геном вируса SV40, сцепленный с геномом аденовируса (рис. 2), свидетельствующий о генетическом взаимодействии разных видов вирусов.

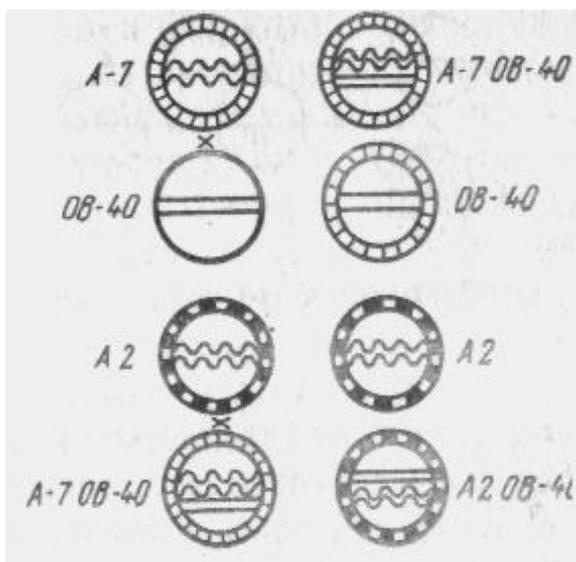


Рис. 2. Транскапсидация

Кросс-реактивация (спасение маркера). Одним термином обозначались два разных явления: реактивация инактивированного генома неинактивированным и взаимная реактивация двух инактивированных геномов. Второе явление лишь условно отличается от множественной реактивации. Это отличие сводится лишь к тому, что при множественной реактивации используют один и тот же вирус с немаркированным геномом, а при кросс-реактивации — обычно два штамма вируса с геномами, маркированными по-разному. Чтобы ликвидировать эту путаницу, по предложению Адаме, с начала шестидесятых годов значение этих терминов разделено: модель Лурия называется «спасение маркера»; модель Апплеби — «кросс-реактивация», а появление полноценного потомства после заражения клетки немаркированным вирусом с частично инактивированным геномом — «множественная реактивация».

Кросс-реактивация — феномен, сходный с множественной реактивацией, однако один из участвующих вирусов используют в нативном виде, а другой — инактивируют путем частичного разрушения генетического материала (УФ-облучением, слабым нагреванием). В этом случае сохраняются нативные не разрушенные участки нуклеиновой кислоты инактивированного вируса, в результате чего могут возникать рекомбинанты, обладающие свойством обоих использованных в опыте штаммов. Этот тип рекомбинации хорошо изучен в опытах с фагами и получил название кросс-реактивации, т.е. реактивации при скрещивании. При кросс-реактивации рекомбинантные формы получить гораздо легче, чем при скрещивании двух нативных вирусов.

Кросс-реактивация имеет место в тех случаях, когда инактивированный геном вводится в клетку до введения интактного генома или при их одновременном введении. При-

чем в литературе описана кросс-реактивация при введении инактивированного генома не только за 24—48 ч, но и за 56—72 ч до введения интактного генома.

Негенетические взаимодействия вирусов. Они включают явления фенотипического смешивания, негенетическую реактивацию, комплементацию, стимуляцию и интерференцию.

Фенотипическое смешивание наблюдается при одновременной репродукции двух генетически различных вирусов и проявляется образованием вирионов с генотипом одного из исходных штаммов, но обладающих антигенными свойствами обоих вирусов. Фенотипически смешанные формы нейтрализуются сыворотками против обоих исходных штаммов, так как в оболочке полученных вирусов появляются структурные белки

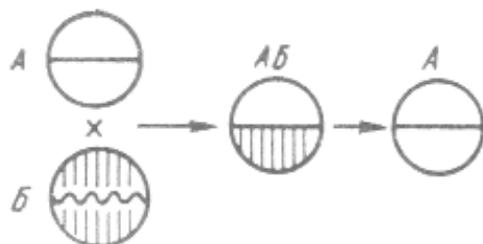


Рис. 3. Фенотипическое смешивание

обоих родительских штаммов. Такие вирионы воспроизводят в первом поколении признаки того штамма, нуклеиновую кислоту которого они содержат (рис. 3). При фенотипическом смешивании объединяются только структурные белки вирусов, генетического же взаимодействия между их нуклеиновыми кислотами не происходит. Явление фенотипического смешивания наблюдали у фагов T2 и T4.

Негенетическая реактивация. Наиболее широко изучена она у вирусов группы оспы. При данном явлении инактивированный вирус (A) в результате денатурации структурных белков приобретает способность размножаться благодаря активности фермента («раздевающего» энзима) другого родственного вируса (B) (рис. 4). Реактиватором может быть не только жизнеспособный вирус B, но и вирус B, ДНК которого повреждена и лишена репликативной функции. Введение «раздевающего» белка (депротеинизирующего фермента) в культуру клеток, инфицированную инактивированным вирусом, ведет к полному освобождению ДНК вирионов инактивированного вируса и запускает полноценный цикл репродукции.

Комплементация наблюдается в тех случаях, когда при мутации в геноме вируса возникают повреждения и он

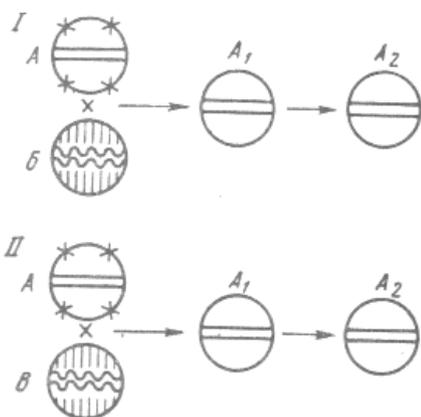


Рис. 4. Негенетическая реактивация

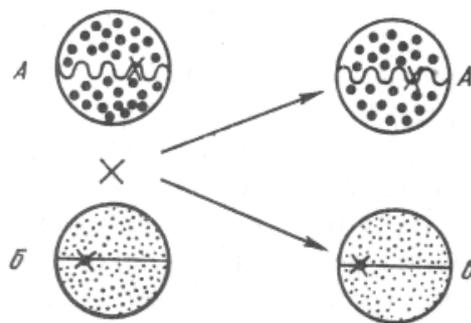


Рис. 5.

Комплементация лишается способности самостоятельной репродукции. Но если в клетку проникают два дефектных штамма, у одного из которых повреждения локализованы в гене, ответственном за синтез, например раннего белка (РНК-полимеразы), а у другого — в гене, программирующем синтез структурного белка, то каждый из них может взаимно использовать фермент, синтез которого индуцируется другим штаммом. В результате такого синергизма два дефектных вируса, не способных репродуцироваться поодиночке, при двойной инфекции проходят полный цикл репродукции. При такой взаимной комплементации генотипы взаимодействующих вирусов не изменяются, заимствуя лишь фермент, синтез которого индуцируется другим вирусом (рис. 5). 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 дефектностью 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). Такой дефектный вирус может использовать ферменты, индуцированные только вторым вирусом-помощником. Вообще к вирусам-помощникам относят такие вирусы, чья репродукция

обеспечивает полную репликацию других вирусов, у которых при отсутствии в клетке соответствующего вируса-помощника репродукция прерывается, не доходя до стадии образования вирусного потомства. Отличие комплементации от генетической рекомбинации заключается в отсутствии обмена генетическим материалом.

Комплементация встречается и у неродственных вирусов, принадлежащих к разным семействам. Одно из них, вирусы которого наиболее часто участвуют в комплементации,— 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.

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

## **7. О ПРИРОДЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ВИРУСОВ. ПРИОНЫ**

### **7.1 Теории происхождения вирусов**

Наши представления о происхождении вирусов претерпели за последние годы значительную эволюцию. Основные гипотезы о происхождении вирусов сводятся к альтернативе:

- 1) вирусы являются потомками первоначальных форм жизни и
- 2) вирусы имеют эндогенное происхождение и являются отделившимися генами или другими клеточными структурами, ставшими автономными.

Согласно первой гипотезе, вирусы являются потомками первоначальных протобионтов, которые приспособились к паразитическому образу жизни в появившихся позже первобытных клеточных формах. Такой образ жизни мог продолжаться на протяжении длительных периодов, и современные вирусы представляют собой потомки многих первоначальных форм жизни. Дальнейшая эволюция их происходила по двум путям соответственно двум направлениям развития органического мира (прокариоты, эукариоты). Появление одноклеточных, а позже многоклеточных растений сопровождалось приспособлением древнейших, вирусов к внутриклеточному паразитированию в них, и отдаленными потомками их являются вирусы высших растений. Появление одноклеточных, а затем многоклеточных животных сопровождалось эволюцией поражавших их вирусов, потомками которых являются ныне существующие вирусы животных. Отдельная ветвь — виру-

сы прокариот (фаги).

На всех этапах эволюции органического мира был возможен обмен вирусами как между близкими, так и между далеко отстоящими таксономическими группами, включая обмен вирусами между растениями и животными. Этим объясняется существование групп сходных вирусов, поражающих филогенетически далеких хозяев, например реовирусы животных и вирусы раневых опухолей растений. Однако это гипотеза оставляет многое необъяснимым. Она не позволяет объяснить причины разнообразия генетического материала у вирусов.

Гипотезу эндогенного происхождения вирусов разделяют большинство вирусологов в связи с накоплением фактов об архитектуре и репродукции вирусов и гласит о том, что вирусы — отделившиеся компоненты клетки. Эта гипотеза допускает, что некоторые ДНК-содержащие вирусы вполне могли возникнуть из эписом ((от эпи... и греч. *sóma* - тело), генетические факторы, способные находиться в клетке либо в автономном (в цитоплазме) либо в интегрированном (включенными в хромосому) состоянии; представляют собой молекулы ДНК. К Э. относятся геном умеренного фага лямбда, некоторые R-факторы, сообщающие бактериям устойчивость к определенным лекарств. веществам, и некоторые др. Э. не являются обязательными компонентами клеток и могут переходить из одного состояния в другое, что зависит от вида клеток. Например, геном умеренного фага лямбда в клетках кишечной палочки может находиться в интегрированном либо в автономном состоянии, а в клетках возбудителя брюшного тифа - только в автономном состоянии. Находясь в автономном состоянии, большинство Э. ведут себя как типичные плазмиды. Ряд авторов видит в Э. переходное звено между структурами, определяющими хромосомную и нехромосомную наследственность) в результате приобретения генетической информации, необходимой для построения биологического чехла. Ряд ученых полагают, что некоторые вирусы могли возникнуть из таких клеточных органелл, как хлоропласты и митохондрии, которые, вероятно, сами произошли от бактерий. Мелкие вирусы, возможно, произошли из компонентов клеток позвоночных, в то время как герпес-, покс- и, вероятно, аденовирусы имеют иное происхождение. Эти крупные вирусы могли произойти из нуклеиновых кислот организмов, принадлежащих к другим типам, или в результате дегенерации микроорганизмов.

Разные группы вирусов неравномерно распределены в органическом мире. Вирусы поистине убиквитарны (повсеместны), и, вероятно, нет ни одного биологического вида, начиная с микоплазм и амёб и кончая цветковыми растениями и приматами, которые бы не были заражены вирусами.

Такая универсальная пораженность органического мира вирусами вряд ли может

быть понятна, если их рассматривать только как паразитов — возбудителей болезней. Имеется много фактов, указывающих на пользу, приносимую вирусами своим хозяевам. Так, например, известно, что свойство вырабатывать токсины возбудителями дифтерии, столбняка и ботулизма не свойственно этим бактериям, а привносится поражающими их умеренными фагами, содержащими гены соответствующих токсинов. Устойчивость бактерий к антибиотикам также является результатом синтеза разрушающих или модифицирующих их ферментов, закодированных в плаزمиде, которые могут передаваться от бактерии к бактерии. Таким образом, имеется много фактов, свидетельствующих о способности вирусов приносить полезную для хозяина информацию. Поражая разные виды, вирусы могут распространять эту информацию не только среди особей одного вида, но также между разными видами.

Имеются еще два крупных раздела вирусологических исследований, разработка которых начата недавно. Это, во-первых, определение места и роли вирусов в эволюции живого и, во-вторых, использование вирусов для генно-инженерных работ. Еще больше возрастает модельная роль вирусов для фундаментальных проблем биологии, особенно для ее центральной проблемы — определения сущности жизни. «...Вирусы дают нам единственный в своем роде ключ к пониманию функции нуклеиновой кислоты, а возможно, и к пониманию природы самой жизни». (У. Стенли, Э. Вэлленс, 1964). Нет сомнения, что в будущем вирусы еще долго сохранят свою модельную роль для раскрытия сущности жизни, так как с них начинается на наших глазах огромный путь от молекул к организму (имеются в виду работы по генной инженерии и изучение связи между структурой и функцией).

Двойственность природы вирусов состоит в том, что их структура находится на молекулярно-генетическом уровне и поддается точным способам изучения, тогда как функции вирусов реализуются на организменном уровне, и исследование их в основном носит описательный характер.

## **7.2 Прионы**

Помимо болезней, вызываемых РНК- и ДНК-содержащими вирусами, имеется необычная группа заболеваний центральной нервной системы — подострых спонгиозных трансмиссивных энцефалопатии (ПСТЭ) — скрепи (заболевание овец и коз), болезнь Крейтцфельда-Якоба; синдром Герстмана-Страусслера-Шейнкера; синдром "фатальной семейной бессонницы"; болезнь Куру; хроническую прогрессирующую энцефалопатию детского возраста или болезнь Альперса, болезнь Альцгеймера — распространенная форма старческого слабоумия. Все перечисленные заболевания отнесены к группе медленных инфекций. Они характеризуются длительным инкубационным периодом, который может

продолжаться месяцы, годы, а то и десятки лет; в это время у зараженного человека или животного нет никаких симптомов. Когда же начинается собственно болезнь, она неуклонно прогрессирует и обычно приводит к гибели организма.

В 1966 г. Гайдушек, Г. Гиббс младший и М. Элперс сообщили о том, что возбудителем куру можно заразить обезьян. Через два года Гайдушек и Гиббс показали, что болезнь Крейтцфельда — Якоба, а также синдром Герстманна — Стрейслера могут также передаваться обезьянам.

Сходство клинических и патологических признаков скрепи, куру, болезни Крейтцфельда — Якоба и синдрома Герстманна — Стрейслера наводит на мысль о близком родстве этих болезней. Во-первых, начальные симптомы скрепи, куру и синдрома Герстманна — Стрейслера — затруднения при ходьбе и потеря координации, свидетельствующие о нарушении деятельности мозжечка. Ни при одной из этих болезней не наблюдается ни воспалительного процесса, ни лихорадочного состояния, состав спинно-мозговой жидкости и число клеток в ней остаются нормальными. Это свидетельствует о том, что иммунная система не реагирует на возбудителей указанных болезней. Патологические изменения при этих болезнях происходят в пределах центральной нервной системы, и характерный признак — ненормальное размножение астроцитов (опорных клеток мозга). В нейронах уменьшается количество дендритных шипиков, важных для передачи нервных импульсов.

Наиболее распространенное из этих заболеваний — скрепи — было впервые описано в Англии еще в XVIII в. Болеют обычно овцы старше 4—4,5 лет. У больных животных сначала появляется расстройство координации движений и кожный зуд, заставляющий их непрерывно чесываться (отсюда и название: англ. to scarp — скрести). Затем наступают параличи, неизбежно заканчивающиеся через несколько месяцев гибелью животных.

В 1960 г. Р. Чэндлер добился успеха в заражении агентом скрепи мышей. В 1978 г. Б. Прузинер и др. обнаружили четкую корреляцию между концентрацией возбудителя и скоростью проявления болезни, а также временем смерти животного.

В отдельных деревнях папуасов племени форе, населяющего горные районы Новой Гвинеи, около 10% людей болели неизвестной болезнью, названной куру (на языке племени форе это слово обозначает «дрожать»). По симптомам эта болезнь очень напоминала скрепи у овец (те же нарушения координации движений и параличи), кроме того, отмечалось слабоумие. К. Гайдушеку, впервые описавшему в 1957 г. куру, и его сотрудникам удалось выяснить путь передачи болезни. Среди жителей этих районов был распространен обычай ритуального каннибализма: в знак уважения к умершему родственнику члены

клана съедали некоторые его внутренние органы и натирали себе кожу его мозгом и печенью. Основными участниками ритуала были обитатели так называемых «женских хижин» — женщины и дети до 6 лет, чем и объяснялось преобладание женщин среди жертв куру. В основном благодаря усилиям К. Гайдушека ритуальный каннибализм был искоренен, и заболеваемость стала быстро сокращаться, причем сначала она исчезла у детей, потом у подростков и молодых людей. В настоящее время наблюдаются лишь единичные случаи заболевания куру среди лиц старше 30 лет. Очевидны два выхода: каннибализм — единственный путь распространения инфекции, инкубационный период заболевания может составлять до 30 лет.

И, наконец, так называемая болезнь Крейтцфельда — Якоба. Она распространена по всему земному шару, но встречается достаточно редко — несколько случаев на миллион населения. Примерно 20% заболеваемости составляет семейная форма; известны семьи, в которых было 12 больных в пяти поколениях. Обычно болезнь проявляется на 40—50-м году жизни и сопровождается опять же нарушениями координации движений, расстройством органов чувств и слабоумием. На поздних стадиях наступают параличи, которые через несколько месяцев (реже лет) приводят к гибели. Путь распространения этой болезни точно не известен.

Все заболевания группы ПСТЭ имеют не только сходную симптоматику, но и похожую патоморфологическую картину: дегенерацию мозговых нейронов, разрастание глиальных клеток и накопление так называемого мозгового амилоида. Образование аналогичных фибрилл при болезни Альцгеймера (старческом слабоумии) позволяет провести параллель между этим широко распространенным заболеванием (по некоторым оценкам, им болеют до 10% лиц старше 65 лет) и ПСТЭ. Распространенность болезни Альцгеймера, естественно, повышает интерес к этой группе болезней.

Хотя эти болезни и не входят в число важнейших медицинских проблем (главным образом потому, что встречаются сравнительно редко), их изучение уже почти 40 лет составляет одну из фундаментальных задач вирусологии, а природа их возбудителей — одну из самых интригующих загадок этой науки.

Чем же отличаются эти возбудители от других, обычных вирусов? Согласно современным представлениям, вирусы — это автономно воспроизводящиеся (реплицирующиеся) генетические системы, которые продуцируют информационную, или матричную, РНК (мРНК), но лишены собственной системы трансляции (синтеза белков) и поэтому используют трансляционный аппарат клетки-хозяина. В результате такого взаимодействия образуются все вирусные белки, в том числе так называемые структурные белки, в которые «одевается» носитель генетической информации — нуклеиновая кислота вируса, без

чего она не может переходить из одной клетки в другую.

Длительное изучение возбудителей ПСТЭ показало, что они почти по всем этим признакам так или иначе отличаются от классических вирусов, что и отразилось в другом их названии — «неканонические вирусы». Результаты последних лет заставляют вполне серьезно обсуждать возможность полного отсутствия нуклеиновых кислот у этих агентов. А поскольку возбудители ПСТЭ обладают такими важными признаками любого живого организма, как наследственность и изменчивость, необходимо понять, как соотносится эта возможность с основными принципами биологии.

Скрепи удалось передать не только норкам, но морским свинкам, мышам и хомячкам. И во всех случаях инфекционный агент проходил через фильтры, задерживающие самые мелкие бактерии. Все четыре возбудителя (куру, энцефалопатии норок, скрепи и болезни Крейтцфельда — Якоба) близкородственны, возможно, это разные штаммы одного и того же «вируса».

Однако по мере изучения «вирусы» скрепи вызывали у исследователей все возрастающее недоумение. Дело в том, что вирусного в них было очень мало.

Кроме двух свойств — способности агента проходить через бактериальные фильтры и мутаций, приводящих к возникновению новых штаммов (что указывает на существование у возбудителя собственного генотипа), все остальные свойства агента были в высшей степени необычными.

Во-первых, в пораженных тканях ни в оптическом, ни в электронном микроскопе никогда не удавалось наблюдать каких-либо структур, похожих на частицы искомого вируса. Во-вторых, все попытки получить у животных антитела против возбудителя окончились неудачей. В-третьих, агент не мог размножаться ни на одной из многочисленных испытанных культур клеток. Но самой поразительной оказалась исключительная устойчивость этого возбудителя к разнообразным воздействиям, эффективно подавляющим инфекционность бактерий и вирусов: нагреванию, обработке формальдегидом, ультрафиолетовому облучению, ионизирующей радиации.

Фиксированные формалином образцы инфекционного мозга (первичные препараты для патогистологии) сохраняют инфекционность после часовой обработки в условиях сухого жара при 360°C. Инактивация агента скрепи ионизирующей радиацией и ультрафиолетом отличалась от инактивации вирусов не только количественно, но и качественно: его чувствительность к ионизирующей радиации резко повышалась в присутствии кислорода, в то время как обычные вирусы таким свойством не обладают. Выраженный «кислородный эффект» характерен для инактивации белковых или липидных систем; для инактивации нуклеиновых кислот присутствие кислорода несущественно. Исследование спектра

действия инактивирующего ультрафиолета показало, что для агента скрепи наиболее эффективен ультрафиолет с длиной волны 235 нм, а не 254—260 нм, как для подавляющего большинства бактерий и вирусов (напомним, что длины волн 254—260 нм соответствуют максимуму поглощения нуклеиновых кислот). Результаты этих экспериментов заронили первые серьезные сомнения в том, что инфекционность агента скрепи связана с нуклеиновой кислотой.

Оказалось, что инфекционный агент скрепи весьма прочно связан с клеточными мембранами и не отделяется от них стандартными методами (обработка детергентами в обычных концентрациях). Исходя из этого была предложена так называемая мембранная гипотеза: агент скрепи не содержит нуклеиновой кислоты, а представляет собой самореплицирующийся фрагмент мембраны. Однако в силу, мягко говоря, неортодоксального характера этой гипотезы и отсутствия детальной биохимической характеристики агента мембранная гипотеза не была воспринята сколько-нибудь серьезно. Исследователи склонны были считать, что агент скрепи все же содержит нуклеиновую кислоту, но она либо имеет некую необычную структуру, либо каким-то образом защищена от инактивирующих воздействий.

В 1971 г. Т. Динер открыл вироиды — удивительные агенты, вызывающие ряд болезней растений. Эти сравнительно мелкие РНК с мол. массой около 100 тыс. Д, лишенные какой-либо оболочки, не кодируют никаких белков (таких размеров хватило бы для кодирования лишь коротких полипептидов) и, очевидно, реплицируются при участии ферментов растительной клетки.

Однако вскоре выяснилось, что воздействия, вполне эффективно инактивирующие вироиды, в частности ферменты, разрушающие РНК (рибонуклеазы), на агент скрепи не влияют. В печати появилось сообщение, что инфекционность этого агента будто бы ассоциирована с низкомолекулярной ДНК, но проверка в других лабораториях не подтвердила этих данных.

Таким образом, к началу 80-х годов природа возбудителей ПСТЭ оставалась по-прежнему таинственной; ясно было лишь, что они качественно отличаются от всех известных инфекционных агентов. Выходом из тупика могла быть только разработка эффективных методов очистки агентов ПСТЭ.

Решению этой задачи способствовало в первую очередь создание в 1971 г. группой исследователей под руководством Г. Чэндлера (Великобритания) относительно быстрого и простого метода титрования инфекционности агента скрепи на сирийских хомячках. У этих животных инкубационный период заболевания намного короче, чем у овец и даже мышей, причем его продолжительность обратно пропорциональна заражающей дозе. Те-

перь определить инфекционность одного образца можно всего лишь за 60—70 дней на четырех хомячках. Таким образом, эксперименты по очистке агента стали посильным делом. Как и следовало ожидать, это привело к быстрому прогрессу исследований.

Разработанные этой группой схемы очистки агента скрепи оказались неожиданно довольно простыми и включали сочетание стандартных методов ультрацентрифугирования и электрофореза; ключевыми этапами явились, по-видимому, освобождение инфекционного агента от мембран путем продолжительной обработки высокими концентрациями детергентов, а также обработка препаратов ферментами, расщепляющими нуклеиновые кислоты (нуклеазами) и белки (протеазами). В результате были получены препараты с достаточно высокой степенью очистки.

В освобожденных от мембран препаратах был обнаружен единственный белок с мол. массой около 30 тыс. Д или набор белков с очень близкими мол. массами. Когда в аналогичных условиях разделяли экстракты нормальных тканей, в соответствующих фракциях также находили белки с мол. массой около 30 тыс. Д. Разница между инфекционными и контрольными препаратами выявлялась при обработке протеазами: в условиях, когда все белки нормальной ткани полностью переваривались, 30 К белок оставался устойчивым. Этот белок расщеплялся лишь при гораздо более длительной протеазной обработке и (или) при более высоких концентрациях фермента. В электронном микроскопе фракции, содержащие инфекционный агент, выглядели как двойные фибриллы диаметром 4—6 и длиной 50—500 нм. Содержание фибрилл в препаратах коррелирует с титром инфекционного агента.

Оказалось, что агент скрепи ведет себя, как белок с мол. массой не менее 16 тыс. Д и не более 50 тыс. Д. Все приведенные данные указывают на то, что 30 К белок является существенным компонентом инфекционного агента. На этом основании С. Прузинер высказал предположение, что агент (ы) ПСТЭ относятся к совершенно новому классу патогенов, не имеющих в своем составе нуклеиновой кислоты, но содержащих необходимый для проявления инфекционности белок. Для обозначения объектов этого класса С. Прузинер предложил термин «прион» (по транслитерации начальных букв первых двух слов в словосочетании *protein infections particle* — белковая инфекционная частица, англ.). Протеин-прион (PrP) представляет собой сиалогликопротеид с молекулярной массой 33000-35000 дальтон, или 33-35 kD, кодируемый единственным геном, расположенным у человека в 20 хромосоме. Он состоит у человека приблизительно из 254 аминокислот, включая 22-членный N-терминальный сигнальный пептид. Прион PrP(c) найден у всех млекопитающих. Его жизненный полупериод составляет несколько часов, но он хорошо сохраняется в течение развития. К настоящему времени установлено 18 различных мутаций гена PrP

человека, которые связаны с различными прионовыми болезнями.

Таким образом, методом исключения пришли к третьей гипотезе, согласно которой прион — это клеточный белок, не синтезируемый в организме (т. е. ген, кодирующий его, в норме не работает).

Прионный белок в пораженных организмах, конвертируется в другую изоформу принципиально отличную от первой по своей физхимии. Конверсия происходит в результате перестройки вторичной структуры молекулы нормального предшественника в непосредственном контакте с патологическим белком (собственно прионный белок) и, возможно, с еще одним белком - белком-помошником. При этом он практически теряет чувствительность к протеазам, сильно снижается его растворимость, приобретает способность к аутоагрегации с образованием амилоидных фибрилл в дальнейшем ведущем к образованию амилоидных бляшек и этот процесс происходит в нервной ткани.

Можно предположить, что и белок приона, встраиваясь в клеточные мембраны, запускает некий специфический каскад протеинкиназных реакций, в результате которых репрессор транскрипции гена приона фосфорилируется и инактивируется.

Следует отметить, что активация белком собственного гена достаточно хорошо известна: таким способом регулируется, например, работа некоторых генов бактериофага X (лямбда).

Предполагаемая гипотеза, по мнению Е. В. Кунина и К. М. Чумакова (1985), не противоречит тому, что известно сегодня о свойствах приона. Косвенным подтверждением существования гена приона в клетке служат данные о взаимодействии разных «штаммов» агента скрепи (различающихся по продолжительности инкубационного периода — единственному надежному генетическому признаку агента) с разными линиями животных. В результате таких исследований выявлены гены *slp* (у овец) и *sine* (у мышей), имеющие множественные аллели, обуславливающие различную длительность инкубационного периода для разных «штаммов» скрепи.

Еще меньше, чем о механизмах репродукции приона, можно сказать о его функциях в нормальной жизнедеятельности животных (если такие функции вообще имеются). Как уже отмечалось, у взрослых животных в норме ген приона, по-видимому, «молчит».

Таким образом, возбудители скрепи и болезни Крейтцфельда — Якоба — это инфекционные агенты, состоящие из крупных белковых молекул.

### **7.3 Вироиды**

Открытие их принадлежит Т. Динеру (1971). Вироиды, как и прионы, — это новые классы субвирусных возбудителей болезней. Они лишены оболочки, "представляют ковалентно замкнутые кольцевые молекулы РНК, состоящие из 246—371 нуклеотидов, не ин-

капсидированы, мол. масса РНК 120 кД. В клетках хозяина вириды локализованы в ядрах; их можно выделить как свободные нуклеиновые кислоты вместе с другими РНК и белками.

В настоящее время кроме вириды веретеновидности клубней картофеля известно еще шесть виридов, поражающих растения: вириды экзокортиса цитрусовых, задержки роста хризантем, хлоротической крапчатости хризантем, болезни «каданг» кокосовой пыльцы, бледных плодов огурцов, вириды, карликовости хмеля, верхушки томатов, «планто мехо» томатов и карликовости лопуха (Сангер, 1984). Не исключено существование виридов, поражающих животных и человека.

Геномы виридов очень малы. Возбудитель веретеновидности клубней картофеля является одним из наиболее крупных. Он состоит из 359 нуклеотидов. Его молекула содержит многочисленные внутримолекулярные спаренные основания, которые организованы в чередующиеся последовательности спиральных участков и отделены друг от друга внутренними петлями.

Высказано предположение о том, что вириды происходят из генетического материала хозяина и представляют пример аутоиндуцирующихся регуляторных молекул.

## **8. ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ**

Иммунология вирусных инфекций в последние годы достигла больших успехов. Советскими учеными созданы эффективные живые и инактивированные вакцины против ряда вирусных болезней животных. Открыты новые факторы и механизмы противовирусного иммунитета (ингибиторы, интерферон, клеточный иммунитет).

В понятие противовирусного иммунитета входят три категории защитных механизмов: 1) естественная видовая резистентность; 2) неспецифические клеточные и общезоологические реакции (участие интерферона, неспецифических ингибиторов, физиологическая температура тела, пиноцитоз вирусных частиц, фагоцитоз зараженных вирусом клеток); 3) специфический приобретенный иммунитет после переболевания или иммунизации (образование его связано с участием В-лимфоцитов в продукции антител класса G, M, A и E, а также с участием Т-лимфоцитов),

### **8.1 Естественная видовая резистентность**

В качестве примеров видового иммунитета можно привести невосприимчивость многих видов животных к вирусам чумы свиней, чумы крупного рогатого скота, африканской чумы однокопытных, невосприимчивость лошади, коровы, овцы, свиньи и других животных к вирусам эпидемического паротита (свинки) человека, ветряной оспы человека и т. п. Существует различная степень напряженности видового иммунитета — от абсо-

лютной резистентности до относительной, которую удается преодолеть с помощью различных воздействий (большие дозы, предварительное рентгенооблучение, обработка кортизоном, изменение метода заражения при серийном пассировании, пассажи на новорожденных и толерантных животных и т. п.).

Естественная невосприимчивость обусловлена отсутствием условий для размножения вируса из-за неспособности клеток обеспечить проникновение и депротенизацию вируса. В естественно невосприимчивом организме отмечается ничтожный выход вируса за пределы местного очага. Подавляющая масса его разрушается в месте первичной локализации. Высокий и практически непреодолимый уровень естественной резистентности организма к определенным вирусам не удается ослабить охлаждением, рентгеновыми лучами, голоданием и другими приемами.

Видовая невосприимчивость зависит от наследственных, возрастных и гормональных факторов.

Влияние возраста. Примером влияния возраста на восприимчивость к вирусу является высокая чувствительность новорожденных мышат, крольчат и котят к вирусу ящура. Взрослые животные этих видов абсолютно резистентны к этому возбудителю. Многие онкогенные вирусы способны вызывать развитие генерализованных опухолей у серийских хомяков, белых мышей и крыс при обязательном заражении их в новорожденном состоянии, когда способность их к иммунологической защите снижена. При нейроинфекциях лабораторные животные проявляют совершенно различную чувствительность к заражению в молодом и взрослом состояниях.

Генетическая обусловленность и наследование видового иммунитета. Видовой иммунитет (или его отсутствие) к определенному вирусу генетически обусловлен (детерминирован) и передается из поколения в поколение в пределах определенных генетических линий одного и того же вида животных. Например, линия мышей PR-1 обладает 100%-ной резистентностью к вирусу желтой лихорадки (штамму 17Д), тогда как мыши линии swiss восприимчивы к этому вирусу в 100% случаев. Доказана наследственная передача резистентности мышей к вирусам looping ill (вертячка овец), весенне-летнего клещевого энцефалита, энцефалита Сан-Луи и т. п. На этом принципе в настоящее время выводятся линии птиц, генетически устойчивые к вирусам лейкоза и болезни Марека.

## **8.2 Неспецифические клеточные и общепфизиологические реакции в противовирусном иммунитете**

Защитная роль температуры. Повреждающее воздействие на вирусы повышенной температуры проявляется инаktivацией их под влиянием нормальной температуры тела животного (36 — 38,5°C). Защитная роль высокой температуры была показана при экспе-

риментальном заражении кроликов вирусом миксомы; содержание их в условиях 39—40 °С предупреждало гибель животных от вирулентного штамма вируса. Напротив, низкая температура внешней среды способствовала усилению тяжести вакцинальной инфекции кроликов, вызванной аттенуированным штаммом. Лихорадка является главным фактором, содействующим выздоровлению от вирусной инфекции. Однако повышение температуры не всегда необходимо для выздоровления. Выздоровление мышей, например, зараженных вирусом гриппа или энцефаломиокардита, происходит и без повышения температуры.

Влияние гормонов. Все известные гормоны не способны непосредственно стимулировать подавление вирусной репродукции. Однако они могут опосредованно влиять на резистентность к вирусным агентам. В защитных реакциях организма принимают участие два антагонистически действующих гормона: кортизон (гидрокортизон) и соматотропный гормон. Большие дозы кортизона снижают резистентность организма как к бактериальным, так и к вирусным инфекциям; он понижает воспалительную и фагоцитарную реакции, замедляет клиренс крови от бактерий и вирусов, понижает продукцию антител и интерферона. Видимо, этим объясняется тяжелое течение вирусных инфекций у животных, обработанных кортизоном. Малые дозы кортизона, наоборот, повышают защитные функции организма.

Соматотропный гормон, или гормон роста, продуцируемый передней долей гипофиза, в отличие от кортизона активизирует воспалительный процесс, усиливает активность плазматически<sup>^</sup> клеток, которые продуцируют антитела.

Беременность усиливает тяжесть течения полиомиелита и оспы. Тестикулярный, овариальный гормоны выражение влияют на снижение резистентности мышей к вирусу ЕМС.

Помимо влияния температуры и гормонов, к неспецифическим иммунным реакциям следует отнести усиление секреторно-выделительной функции клеток, что способствует освобождению их от вируса, образование в пораженных вирусом гриппа эпителиальных клетках цитоплазм этических оксифильных включений. Полагают, что такие включения представляют «микрocolонии» вирусных частиц и являются своеобразной защитной реакцией клетки. Преобладание оксифильных телец-включений свидетельствует о более легком, а базофильных — о более тяжелом течении экспериментальной гриппозной инфекции.

Влияние функции выделительной системы, ацидоза и гипоксии. К неспецифическим факторам противовирусного иммунитета относится функция выделительной системы. Так, вирусы экстремелии и герпеса, введенные в организм естественно невосприимчивых и иммунных животных, могут выделяться со слюной, с секретом респира-

торного тракта, молоком, через кишечник.

Не всегда резистентность животного к вирусной инфекции соответствует резистентности его клеток. Так, человек резистентен к вирусу классической чумы птиц, хотя этот вирус успешно размножается в культуре ткани легких эмбриона человека. Кролик резистентен к вирусу ящура, однако культура клеток почки крольчонка является прекрасной средой для репродукции данного вируса. Подобных примеров можно привести множество. Все они свидетельствуют об изменении чувствительности клеток после их эксплантации из организма. Видимо, в организме резистентных животных благодаря функции других факторов естественного иммунитета складываются иные взаимоотношения вируса и клетки, чем в культуре клеток.

Гуморальные факторы, неспецифической резистентности. Ингибиторы сывороток крови. Кроме антител — специфического фактора противовирусного иммунитета — организм вырабатывает особые вирусотропные вещества — ингибиторы, способные взаимодействовать с вирусами и подавлять их активность. Сывороточные ингибиторы обладают широким диапазоном действия: одни подавляют гемагглютинирующие свойства вирусов, другие — их цитопатогенное действие, третьи — их инфекционную активность.

Ингибиторы к вирусам гриппа в нормальных сыворотках человека и животных впервые обнаружил в 1942 г. Херст. В 1957 г. было установлено, что вирусы гриппа неодинаково подавляются сывороточными ингибиторами: штаммы типа С в высоких титрах ингибируются сыворотками крыс, штаммы типов А1 и В — сыворотками морских свинок. Далее последовали сообщения о наличии ингибиторов к ДНК- и РНК-содержащим вирусам (парагриппа, ньюкаслской болезни, энцефалита лошадей, герпеса, адено-, палова-, реовирусам и др.). Ингибиторы, видимо, обладают антигенными свойствами; некоторым исследователям удавалось получать антиингибиторные сыворотки, блокирующие активность ингибиторов в РТГА.

Термолабильные  $\beta$  ингибиторы содержатся в нормальных сыворотках человека и животных (морских свинок, белых крыс, кроликов, кур, овец, лошадей, коров, свиней, кошек и др.). Они обладают широким диапазоном вируснейтрализующего действия, способны блокировать гемагглютинирующую активность вирусов гриппа А1, А2, В. Сендай, ньюкаслской болезни, кори, арбовирусом и других и нейтрализовать инфекционные и иммуногенные свойства, ингибиторочувствительных вирусов.

Термостабильные  $\gamma$  - ингибиторы высокоактивны против современных вариантов вируса гриппа. Открытие их связано с появлением нового варианта вируса гриппа А2 (1957, H2N2). Одни штаммы этого типа вируса оказались высокочувствительными, другие — устойчивыми к действию ингибиторов и были разделены на ингибиторочувствитель-

ные (ИЧ) и ингибиторорезистентные (ИР).

Термостабильные  $\alpha$  - ингибиторы блокируют гемагглютинирующую, но неинфекционную активность вируса. Для оценки активности  $\alpha$  - ингибиторов (например, ингибитора Фрэнсиса) испытуемые сыворотки исследуют с индикаторным вирусом, лишенным энзиматической активности после прогревания при 56 °С в течение 30 мин и высокочувствительным к действию  $\alpha$  -ингибиторов.

Критерием разделения сывороточных ингибиторов на термостабильную и термолабильную группы является их устойчивость к прогреванию при 56 °С в течение 30 мин. Но гарантированное разрушение их происходит при 60—62 °С в течение часа.

Установлены глубокие отличия биохимической природы ингибиторов и их количественное содержание в сыворотках различного вида животных. Между ингибиторами и антителами имеется разница во взаимодействии их с вирусом гриппа: в отличие от антигенов комплекс ингибитор — вирус не фиксирует комплемент, и второе — вирусные гемагглютинины, нейтрализованные ингибиторами, не теряют способности к последующей реакции со специфическими противовирусными антителами. Оказалось, что такой блокированный ингибиторами вирус может извлекать из сыворотки специфические антитела в такой же степени, как и вирус нативный. Однако вирус, блокированный антителами, не способен извлекать ингибиторы из нормальной кроличьей сыворотки.

Если в сыворотке одновременно присутствуют антитела и ингибиторы, то с вирусом соединяются прежде всего антитела, а ингибиторы при некотором избытке антигенов с вирусом не взаимодействуют. Из этого следует, что специфические антитела по сравнению с ингибиторами имеют большую авидность к вирусным рецепторам и, вступая в комплекс вирус — ингибиторы, вследствие большего авидитета вытесняют ингибиторы. Вирусные частицы способны освобождаться от блокирующего действия ингибиторов и восстанавливать вновь свою гемагглютинирующую активность. Наоборот, специфические антитела образуют с вирусом более прочную связь, не дают диссоциации, и вирус не восстанавливает блокированных гемагглютининов.

Освобождение сывороток от ингибиторов. Для освобождения сывороток от ингибиторов существует ряд методов: обработка углекислым газом, фильтратом холерного вибриона, ацетоном, перйодатом калия или натрия, риванолом. Но далеко не все методы удобны в работе и гарантируют полное устранение ингибиторов из сывороток животных.

### **8.3 Роль фагоцитоза в противовирусном иммунитете**

Ранее считалось, что роль фагоцитоза в противовирусном иммунитете не имеет существенного значения. Вирусы легко адсорбируются на поверхности лейкоцитов и проникают в них. Однако последующего разрушения их не происходит, так как фагоциты

оказались не способными переваривать захваченные ими вирионы. Некоторые вирусы даже могут репродуцироваться в лейкоцитах (вирусы африканской чумы свиней, чумы крупного рогатого скота). Однако отрицать роль фагоцитарных клеток в противовирусном иммунитете нет основания. В защите организма от вирусных инфекций фагоцитоз играет важную роль, но проявляется фагоцитозом не вирионов, а инфицированных ими чувствительных клеток, эритроцитов, тромбоцитов и других частиц, доступных для фагоцитоза.

По новой классификации фагоцитарные клетки именуют «системой мононуклеарных фагоцитов», которая включает промоноциты костного мозга (клетки-предшественники), моноциты периферической крови (подвижные клетки, образуемые в результате деления промоноцитов) и тканевые макрофаги, которые находятся в печени, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге, нервной системе.

Освобождение крови от посторонних частиц и бактерии (клиренс) осуществляется макрофагами печени (купферовские клетки) и красной пульпой селезенки, причем скорость очищения крови от вирусов зависит как от биологических свойств вирусов (их размеров, вирулентности) и величины вводимой дозы, так и от степени резистентности организма, активности его клеточных и гуморальных факторов иммунитета.

Устойчивость вирусов к фагоцитозу не абсолютна; по этому свойству между ними установлены существенные различия. Крупные вирусы экстремелии, осповакцины, простого герпеса и везикулярного стоматита выводятся из крови быстрее, чем мелкие энтеровирусы. Специфические противовирусные антитела вызывают агрегацию вирионов и их опсонизацию. Такие нейтрализованные антителами агрегаты вирионов захватывают макрофаги и переваривают их. Комплемент повышает прочность связи антител с вирусами, способствует укрупнению агрегата вирионов, их опсонизации, клиренсу (очищению) крови и фагоцитозу. Однако в отличие от бактерий вирусы более устойчивы к ферментам фагоцитов, поэтому процесс переваривания их фагоцитами происходит не во всех случаях.

В процессе иммунизации организма макрофаги подвергаются специфической перестройке. Она выражается в их способности более быстро разрушать фагоцитированный вирус, в большей устойчивости к цитопатическому действию вируса гриппа, а также в неспособности поддерживать синтез V- и S-антигенов вируса и давать гемадсорбцию по сравнению с макрофагами, не подготовленными иммунизацией животных. Установлено, что противовирусная активность различных категорий фагоцитарных клеток неодинакова. Полиморфноядерные нейтрофилы иммунизированных кроликов не разрушают вирус осповакцины, а мононуклеары тех же животных не только фиксируют, но и дез-

интегрируют его. Ряд авторов показали, что очищение крови от энтеровирусов (Коксаки группы В и А9, полиомиелита) обусловлено функцией макрофагов, которые у иммунных животных более активно переваривают вирус. Если последний предварительно обработать (сенсibilизировать) специфическими гамма-глобулинами, то процесс ферментативного переваривания его может происходить и в макрофагах нормальных животных. Фагоцитированные вирусы гибнут под влиянием кислого содержимого вакуоли и ферментов фагоцитов.

Таким образом, более ранние представления о принципиальном различии вирусов и бактерий по их отношению к фагоцитозу не являются абсолютными. Оказалось, что и некоторые бактерии (брюшного тифа, инфлюэнцы, токсигенные штаммы стафилококков, гонококки) сохраняют жизнеспособность, будучи фагоцитированными.

Однако клеточные факторы иммунитета не ограничены только фагоцитозом, как предполагалось, раньше. Клетки ретикулоэндотелиальной системы продуцируют антитела, интерферон, комплемент, энзимы и другие вещества, являющиеся факторами иммунитета.

#### **8.4 Интерферон**

Роль интерферона. Открытие интерферона — это новая глава иммунологии — учения о невосприимчивости организма к инфекциям. Интерферон — особый противовирусный белок, продуцируемый зараженными клетками или целым организмом. Открыли его английские вирусологи Айзеке и Линденман (1957). Этому открытию предшествовало большое число работ по вирусной интерференции. Собственно, из наблюдений за этим биологическим феноменом и родилась идея поиска специфического антивирусного белка.

Свойства интерферона. Существует не один интерферон, а интерфероны, т. е. не единый белок, а класс белков, различающихся разной мол. массой и другими параметрами. Интерфероны, индуцированные вирусами, имеют мол. массу  $26—38 \times 10^3$  Д, а индуцированные липополисахаридами бактерий —  $89—90 \times 10^3$  Д.

По антигенной специфичности интерфероны делятся на альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ ).

Индукция интерферона. В клетках человека имеется 27 генетических локусов для интерферонов, из которых 14 являются функционирующими. Интерфероны закодированы в генетическом аппарате клетки. Гены, кодирующие фибробластный ( $\beta$ ) интерферон, располагаются во 2-й и 9-й и длинном плече 5-й хромосомы, а ген, регулирующий транскрипцию, — в коротком плече той же хромосомы. Ген, детерминирующий восприимчивость к действию интерферона, локализован в 21-й хромосоме. Ген для  $\alpha$ -интерферона

располагается в 9-й хромосоме, для  $\gamma$ -интерферона — в 11-й хромосоме.

Система интерферона не имеет центрального органа, так как способностью вырабатывать интерферон обладают все клетки организма позвоночных животных, хотя наиболее активно вырабатывают его клетки белой крови.

Интерферон спонтанно не продуцируется интактными клетками, и для образования его нужны индукторы, которыми могут быть вирусы, бактериальные токсины, риккетсии, экстракты из бактерий и грибов, фитогемагглютинины, синтетические вещества — поликарбоксилы, полисульфаты, декстраны, но наиболее эффективными индукторами интерферона являются двуспиральные РНК: двуспиральные вирусные РНК и двуспиральные синтетические сополимеры рибонуклеотидов (поли-ГЦ, поли-ИЦ), убитые и живые вирусы. Индукция интерферона происходит вследствие дерепрессии его генов.

Вирусиндуцированный интерферон имеет два типа —  $\alpha$  и  $\beta$ . Индукторами ( $\alpha$ -интерферона являются фитогемагглютинин (ФГА) и стафилококковый энтеротоксин (СЭА). Индуктор  $\alpha$ -интерферона — вирус ньюкаслской болезни, многие вирусы (преимущественно РНК-содержащие), синтетические полирибонуклеотиды (преимущественно двуспиральные) и ряд других веществ. Вирус ньюкаслской болезни используется для промышленного и лабораторного производства лейкоцитарного интерферона. Сегодня круг индукторов интерферона чрезвычайно широк. Однако ни один из известных интерферогенов в полном объеме не отвечает всем критериям, предъявляемым к ним в медицинской и ветеринарной практике. Одни интерферогены индуцируют образование интерферона *in vivo*, другие же *in vivo* и *in vitro*. Другие вещества индуцируют образование эндогенного интерферона *in vivo* при введении в организм.

Хорошим индуктором интерферона является двуспиральная РНК тогда как вирусная ДНК не обладает интерферогенными свойствами. К числу наиболее изученных и перспективных не антигенных индукторов интерферона *in vivo* и *in vitro* относится синтетическая двуспиральная РНК, состоящая из комплекса полиинозиновой и полицитидиловой кислот — поли (И) и поли (Ц). В настоящее время больше ориентируются на природные двуспиральные РНК, и в частности на реплика-тивную форму РНК бактериофагов (фага 2). По активности этот индуктор не уступает комплексу полиинозиновой и полицитидиловой кислот — поли (И) и поли (Ц). В качестве индуктора интерферона в клеточных культурах животного происхождения используют вирусы растений, которые обеспечивают более продолжительный срок интерферонообразования.

При индукции интерферонов синтезируется два или более его типов. Так, при индукции ИФН на лимфобластах образуется 87% лейкоцитарного и 13% фибробластного интерферона, а на фибробластах имеют место обратные соотношения. Между тремя типа-

ми ИФН-ов могут существовать синергетические взаимодействия.

Из вирусов наиболее активные индукторы — миксо- и арбовирусы. Интерферогенность вирусов возрастает с уменьшением их вирулентности для организма и цитотоксического действия на культуру клеток. Поэтому лучше использовать апатогенные живые вакцинные штаммы (против гриппа, свинки, полиомиелита, ньюкаслской болезни и др.). К слабым индукторам относятся вирусы герпеса, адено- и онковирусы.

Индукторы интерферона невирусной природы (бактериальные эндотоксины, полисахариды, нуклеиновые кислоты микробного происхождения) стимулируют более быстрое и кратковременное накопление в организме «тяжелого» интерферона с мол. массой  $20 \times 10^3$  Д. В тканевых культурах вирусы индуцируют «легкие», а в организме животных — «тяжелые» интерфероны.

В настоящее время аэрозольный способ введения индукторов интерферона применяется для профилактики респираторных вирусных инфекций у человека.

Помимо применения готовых препаратов интерферона, уже нашедших применение в медицине, сейчас в клиническую практику внедряются перспективные индукторы эндогенного интерферона, поскольку последний дает более значительный защитный эффект при вирусных болезнях, чем экзогенный (Ф. И. Ершов, 1985).

Механизм образования интерферона в клетке. Генетическая информация для продукции интерферона содержится в ДНК клетки, и для его образования в клетке необходим предварительный синтез информационной РНК на матрице клеточной ДНК, в первые часы после заражения. Репликацию иРНК для интерферонов катализирует клеточная РНК-полимераза. Из клеток фибробластов эмбрионов кур выделены иРНК интерферона и репрессоры его продукции. Установлено, что накопление РНК репрессора происходит несколько раньше, чем РНК интерферона. Время трансляции РНК интерферона составляет 25—30 мин, а РНК репрессора — 30—35 мин (Э. Б. Тазулахова, В. В. Зайцева, Ф. И. Ершов, 1980). Регуляция индукции и репрессии синтеза интерферона имеет свой особый механизм, основанный на концепции Жакоба и Манно относительно регуляторных механизмов в клетке (репрессия, индукция).

Механизм интерферонообразования делят на несколько периодов:

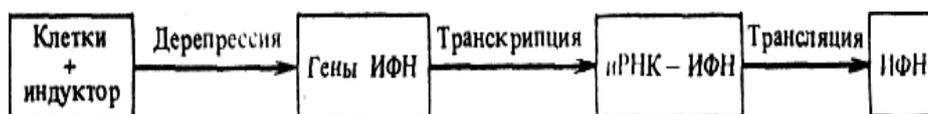
I фаза — индукция интерферона (процесс чувствителен к ингибиторам синтеза белка): 1) адсорбция индуктора на поверхности клетки; 2) «захват» индуктора клеткой; 3) процесс инициации индукции; 4) дерепрессия генов интерферона; 5) транскрипция иРНК для интерферона (иРНК—ИФН);

II фаза — продукция интерферона (процесс чувствителен к ингибиторам синтеза белка): 1) трансляция иРНК—ИФН; 2) пост-1-трансляционные превращения полипеп-

тида с образованием интерфероида; 3) гликозилирование интерфероида с образованием интерферона; 4) выделение (секреция) интерферона.

Весь интерферон в клетках синтезируется после индукции *de novo*. Практически все клетки в той или иной мере способны образовывать интерферон, исключая клетки линии Vero.

Схематически механизм продукции интерферона может быть представлен следующим образом:



Промежуток времени между начальным взаимодействием индуктора и клетки (адсорбция индуктора) и появлением интерферона, рассматриваемый как lag-период, зависит от характера системы индуктор - клетка. При использовании в качестве индуктора вируса lag-период обычно длится 4—8 ч.

Продукция эндогенного интерферона. Интерферон можно получить через 4 ч после внутривенного введения интерферогена. Например, сывороточный интерферон образуется *in vivo* при внутривенном введении мышам вируса ньюкаслской болезни или бактериального липополисахарида. Для индукции эндогенного интерферона используют интерферогенноактивный вирус. Интерферон образуется быстро, но при острых самостерилизующихся вирусных инфекциях обнаруживается в течение сравнительно короткого времени и дольше при хронических инфекциях.

Противовирусная резистентность клеток под влиянием интерферона развивается в определенной последовательности. Невосприимчивость клеток к вирусам наступает через 30 мин после контакта с интерфероном  $\alpha$  и через 2 ч после контакта с интерфероном  $\gamma$ . Далее резистентность повышается и достигает Наивысшего значения через 7—9 ч, после чего сохраняется на постоянном уровне.

Механизм антивирусного действия интерферона. Интерферон не влияет на адсорбцию вируса, виropексис, депротенинизацию вирионов, освобождение вирусной нуклеиновой кислоты, композицию вирионов и выход их из клетки. Он не действует на внеклеточный (экстрацеллюлярный) вирус, он подавляет его репродукцию, т. е. действует на вирус опосредованно через чувствительные клетки, в которых не нарушен синтез, клеточной РНК и клеточных белков. Поэтому актиномицин Д, подавляющий синтез клеточных РНК и белка, подавляет и действие интерферона.

Интерферон не обладает видоспецифическим антивирусным действием. Будучи индуцирован вирусом ньюкаслской болезни, № подавляет репродукцию не только этого

вируса, но и целого ряда других. Однако он обладает видотканевой специфичностью, т. е. более активен в той биологической системе, в которой репродуцирован. В последние годы накапливается все больше данных, противоречащих представлениям о видовой специфичности интерферона. Так, человеческий лимфобластоидный интерферон, полученный в культуре клеток Namalva и индуцированный вирусом Сендай, проявляет одинаково высокую противовирусную активность в культурах клеток обезьян, легкого плода человека и эндотелиальных клеток аорты морских свинок. Или, например, показана способность лейкоцитов крови свиней продуцировать интерферон такой же активности, как и нативный человеческий лейкоцитарный интерферон.

Интерферон связывается с клеточными рецепторами, находящимися на плазматической мембране, что служит сигналом для депрессии соответствующих генов. В результате индуцируется синтез особой протеинкиназа PKds, которая присутствует и следовых количествах во всех клетках млекопитающих и активируется низкими концентрациями двуспиральной РНК, а в зараженных вирусами клетках — вирусными репликативными комплексами.

Протеинкиназа фосфорилирует  $\alpha$ -субъединицу иницирующего фактора трансляции eIF-2, и фосфорилирование блокирует активность иницирующего фактора. В результате иРНК, связанная с Иницирующим комплексом, не может связаться с большой рибосомальной субъединицей и поэтому ее трансляция блокируется. Иницирующий фактор eIF-2 в одинаковой степени необходим для Трансляции как клеточных, так и вирусных иРНК, однако преимущественно блокируется трансляция вирусных иРНК, связанных с вирусными двуспиральными РНК-структурами; в результате Локальной активации протеинкиназы.

В Обработанных интерфероном клетках индуцируется синтез фермента снтетазЫ, которая катализирует продукцию, 2,5-оЛИ-гоаденийЛов&й кислоты, переключающей действие клеточных нуклеаз на рйзруЩение вирусных иРНК. Таким образом, вирусные иРНК подвергаются разрушению нуклеазами.

Блокирование интерфероном стадии инициации трансляции и разрушение иРНК обуславливают его универсальный механизм действия при инфекциях, вызванных вирусами с разным генетическим материалом.

Интерферон защищает клетки от вирусной инфекции лишь в том случае, если воздействует на них до контакта с вирусом. В организме и в клеточных культурах он оказывает как иммуностимулирующее, так и иммуносупрессивное действие, причем последнее особенно выражено при использовании концентрированного препарата. Интерферон активизирует эффекторные клетки иммунной защиты, главным образом макрофаги и кил-

лрные клетки, повышая их способность убивать опухолевые клетки. Он тормозит рост пролиферирующих клеток, в том числе опухолевых.

В антивирусном состоянии клеток под влиянием интерферона ведущую роль играет синтез двух ферментов: синтетазы, осуществляющей после активации эндонуклеазы деградацию вирусных РНК, и протеинкиназы, ингибирующей начальные этапы синтеза вируса. Ключевым моментом в механизме действия интерферона является фосфорилирование малой субъединицы иницирующего фактора трансляции ЕИФ-2, ассоциированного с рибосомами (А. Ziblestein и др., 1976; J. Cooper и др., 1977). Интерферон ингибирует трансляцию иРНК (в первую очередь вирусных) путем индукции повышенного синтеза дсРНК-зависимых ферментов протеинкиназы (2'—5') АН-оли-госинтетазы.

#### Практическое применение интерферона.

В практическом использовании интерферона в настоящее время намечаются два пути: применение готового экзогенного гомологичного интерферона и индукция в организме эндогенного интерферона. Однако, учитывая выраженную видовую специфичность интерферона для профилактики и лечения вирусных инфекций, практически может быть использован только эндогенный интерферон. При этом наилучший защитный эффект получают при меньшем количестве введения в организм препарата-индуктора, вызывающего интерферонообразование в организме. Достигается это при аэрозольном способе его введения. Поэтому аэрозольная вакцинация животных и птицы в ряде случаев более эффективна, чем подкожное и внутримышечное применение. Считают, что концентрация интерферона, которая образуется в носовом секрете при заражении авирулентным штаммом ИРТ, достаточна для того, чтобы блокировать или ингибировать заражение телят некоторыми вирусами, вызывающими заболевание верхних дыхательных путей крупного рогатого скота.

Доказана передача эндогенного интерферона потомству, что позволяет создавать невосприимчивость мышей-сосунов к некоторым вирусным инфекциям.

Экзогенный интерферон в терапевтических дозах совершенно безвреден. Ни генетических последствий, ни аллергических реакций этот препарат не вызывает. Однако готовый лейкоцитарный интерферон не нашел широкого применения из-за выраженной видовой специфичности. Он активен, если его готовить на лейкоцитах крови людей. Применение экзогенного лейкоцитарного интерферона оказалось перспективным только при локальных вирусных инфекциях глаз и кожи. В перспективе имеется более широкая возможность клинического использования интерферона в связи с успешными работами по интеграции гена человеческого интерферона в геном *E. coli*. Методом генной инженерии уже получен интерферон с активностью 500000 ЕД из 1 л бактериальной культуры.

Данные о применении интерферона для предупреждения гриппа неоднозначны. Основные причины разноречивости оценок обусловлены неодинаковой чувствительностью различных штаммов этого вируса к интерферону и отсутствием стандартных схем использования индукторов интерферона.

Динамика накопления эндогенного интерферона и антител у однократно и повторно иммунизированных животных различна. Предполагают, что купирование вспышек кори противокоревыми вакцинами происходит не за счет повышения уровня антител, а за счет раннего появления в их организме неспецифического фактора иммунитета — интерферона.

Важна роль интерферона в выздоровлении организма. Максимальное накопление его выражено в период виремии. Он участвует в период, предшествующий накоплению, антител. Начало выздоровления совпадает с усилением способности лейкоцитов продуцировать интерферон. Интенсивность продукции интерферона лейкоцитами отражает не только устойчивость людей к вирусным инфекциям, но и функциональную активность лимфоидной ткани вообще.

Интерферон оказывает противоопухолевое действие при парэнтеральном введении в больших дозах, связанное с подавлением им цитопролиферативной активности. Интерферон является регулятором различных механизмов иммунного ответа, оказывая стимулирующее или угнетающее действие на иммунные реакции.

В настоящее время человеческий  $\beta$ -интерферон производится в США генно-инженерным методом, он оказался эффективным при ревматоидном артрите. В сочетании с интерлейкином он проходит клинические испытания эффективности в терапии миеломы, лейкоза, рака мочевого пузыря, гепатита В и др.

Получение и титрование интерферона. Его получают *in vitro* в культурах клеток или во взвесах лейкоцитов, причем если активность культурального интерферона составляет 1:16, то лейкоцитарного—1 : 512, а продуцированного макрофагами— 1 : 2000—1 : 4000. В принципе любые клетки продуцируют интерферон, но более активными из них являются макрофаги. Интерферон  $\alpha$  получают в культуре лейкоцитов или клеточной линии Namalwa путем индукции вирусом Сендай; интерферон  $\rho$  — в фибробластах при индукции синтетическими РНК; интерферон  $\gamma$  — в культурах лейкоцитов, стимулированных митогенами.

Для получения высокоактивных препаратов интерферона каждая клеточная система требует тщательного подбора вируса-индуктора и заражающей дозы вируса. Например, клеточные культуры щитовидной железы человека оказались более пригодными продуцентами интерферона по сравнению с клеточными культурами фибробластов эмбриона человека и диплоидными клетками. Лейкоциты свиньи хорошо продуцируют интерферон, удельная активность свиного интерферона выше, чем человеческого.

Вопросы для сдачи зачета по дисциплине «Вирусология»

1. Развитие учения о вирусах
2. Вирусология как биологическая наука
3. Связь вирусологии с другими биологическими науками
4. Природа вирусов
5. Основные группы вирусов
6. Химический состав вирусов
7. Вирусные нуклеиновые кислоты
8. Вирусные белки
9. Вирусные липиды
10. Вирусные углеводы
11. Структура вирусов: вирусы с кубическим типом симметрии
12. Структура вирусов: вирусы со спиральным типом симметрии
13. Вирусные липопротеидные оболочки.
14. Структура фагов
15. Номенклатура вирусов
16. Критерии систематики вирусов
17. Краткая характеристика основных структур и свойств ДНК-вирусов
18. Краткая характеристика основных структур и свойств классифицированных семейств РНК- вирусов
19. Предполагаемые семейства Filo- и Birnaviridae
20. Порядки
21. Общее представление о репродукции вирусов
22. Адсорбция вирионов на поверхности клетки
23. Проникновение вирусов в клетку
24. Раздевание вируса в клетке
25. Вторая фаза репродукции вирусов: транскрипция
26. Вторая фаза репродукции вирусов: трансляция информационных РНК
27. Репликация генома ДНК- вирусов
28. Репликация генома РНК - вирусов
29. Синтез вирусных белков
30. Сборка вирусных компонентов
31. Выход вируса из клетки
32. Типы взаимодействия вируса с клеткой
33. Реакция клетки на вирусную инфекцию
34. Патологические изменения в клетке зараженной вирусом
35. Структурная организация генома вируса
36. Мутации у вирусов
37. Спонтанные мутации у вирусов
38. Индуцированные мутации у вирусов
39. Репарация
40. Формы генетических воздействий: рекомбинация
41. Виды и механизмы рекомбинации
42. Формы генетических воздействий: множественная реактивация
43. Формы генетических воздействий: пересортировка генов
44. Формы генетических воздействий: гетерозиготность
45. Формы генетических воздействий: транскрипция

46. Формы генетических воздействий: кросс-реактивация
47. Формы генетических воздействий: гетерозиготность
48. Негенетические взаимодействия: фенотипическое смешивание
49. Негенетические взаимодействия: негенетическая реактивация
50. Теории происхождения вирусов
51. Прионы
52. Виройды
53. Естественная видовая резистентность
54. Неспецифические общефизиологические реакции: защитная роль температуры и влияние гормонов
55. Неспецифические общефизиологические реакции: влияние функции выделительной системы и гуморальные факторы, неспецифической резистентности
56. Интерферон
57. Механизм противовирусного действия интерферона
58. Роль антител в противовирусном иммунитете
59. Факторы клеточного иммунитета

## 9. БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

### Обязательная

1. Основы медицинской бактериологии, вирусологии и иммунологии: Учеб. пособие / Под ред. Г. М. Шуба. - М.: Логос, 2003. - 264с.
2. Практикум по общей вирусологии: Учеб. пособие / Под ред. И. Г. Атабекова. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Изд-во МГУ, 2002. - 184с.

### Дополнительная

1. Райкис, Б. Н. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении): Учеб. пособие / Райкис, Б. Н., Пожарский, В. О., Казиев, А. Х. - М.: Триада-Х, 2002. - 352с.