

Вступ

Ми живемо, занурені в океан вірусів

Сказати, що віруси повсюдно поширені, означає не сказати нічого. Фактично ми живемо в океані вірусів. Для когось це може здаватися дивовижним, але абсолютно кожен живий організм, починаючи від бактерій і архей і закінчуючи людиною, інфікований вірусами. Звичайно, не усі види, що населяють Землю, відомі, і не усі відомі види перевіряли на вміст вірусів, проте у всіх перевірених видів були знайдені віруси. Є висока кореляція між інтенсивністю вивчення певного виду і кількістю вірусів, знайдених у цього виду. Очевидно, що найбільшу увагу привертає наш власний вид, оскільки ми дуже цікавимося вивченням інфекційних агентів і процесів, які впливають на наше здоров'я. Тому не дивно, що найбільша кількість з відомих вірусів заражає людей, і постійно відкривають нові віруси людини. Численні дослідження були присвячені кишковій паличці *Escherichia coli*, і у цієї бактерії також виявлено багато вірусів. Проте чимало видів живих організмів слабо вивчені щодо вірусів, що вражають ці види. Ймовірно, якби якому-небудь із слабо вивчених видів було приділено таку ж увагу, як і людині, то кількість відомих вірусів, що вражають цей вид, була б порівнянна з кількістю вірусів, знайдених у людей.

Поза сумнівом, кількість вірусів, відома на сьогодні, є тільки малою долею усіх вірусів, що мешкають на нашій планеті.

Кожен вид живих істот вражається своїм власним набором вірусів, які переважно вражають саме цей вид. Чи забезпечує володіння вірусом перевагу для якого-небудь виду живої істоти? Відповідь на це питання не відома, значно більше інформації є стосовно негативних наслідків вірусних інфекцій. Проте очевидно, що віруси не призвели до вимирання своїх хазяїв. Віруси можуть викликати дуже серйозні інфекції, що призводять до летального результату. Проте у більшості випадку віруси взагалі не заподіюють шкоди своїм хазяям. Організм людини містить величезну кількість вірусів в легенях, кишечнику, деяких інших частинах. Генетичний матеріал вірусів інтегрований в наш геном – принаймні 8% нашого генетичного матеріалу є геномами ретровірусів, що вбудувалися в наші хромосоми.

Чому необхідно вивчати віруси?

Деякі віруси є інфекційними агентами, що викликають захворювання людей, починаючи від звичайнісінької застуди і закінчуючи летальними хворобами, типу сказу чи СНІД. Віруси викликають утворення деяких типів злоякісних пухлин. Хвороби, що викликають віруси, виявляються важливими чинниками розвитку суспільства. У колишні часи значний вплив робила віспа; нині подібний вплив робить СНІД.

Таким чином, потрібне розуміння природи вірусів, знання процесів їх реплікації і механізмів розвитку захворювань, що викликаються ними. Такі знання дозволяють розробляти ефективні заходи по запобіганню, діагностиці і лікуванню вірусних інфекцій. Медичні аспекти є дуже важливою частиною вірусології.

Проте важливими є також ветеринарна вірусологія і вірусологія рослин, оскільки багато вірусів викликають хвороби домашніх тварин і сільськогосподарських культур. Ще однією галуззю, де віруси спроможні заподіювати економічний збиток, є молочна індустрія, оскільки бактеріофаги можуть заражати молочнокислі бактерії, за допомогою яких виготовляються сири, йогурти і інші молочні продукти.

Віруси не можна розглядати як виключно шкідливі об'єкти, які заподіюють нам страждання і заважають добре жити. Деякі віруси приносять користь в різних областях людської

діяльності, або потенційно можуть мати практичне застосування.

- **Визначення штамів бактерій за допомогою бактеріофагів.** У окремих груп бактерій, таких як деякі види роду *Salmonella*, штами виділяють на основі спектру фагів, до яких вони сприйнятливі. Ідентифікація бактерійних ізолятів забезпечує важливу епідеміологічну інформацію при спалахах захворювань, що викликаються цими бактеріями.

- **Віруси як джерела ферментів.** Низка ферментів, які використовують в молекулярній біології, є ферментами вірусів. Прикладом є зворотна транскриптаза ретровірусів або РНК-полімераза фагів.

- **Віруси як пестициди.** Деяких комах-шкідників контролюють за допомогою бакуловірусів, а вірус міксоми (збудник міксоматозу) використовується для контролю чисельності кроликів.

- **Віруси як антибактеріальні агенти.** В середині 20-го століття бактеріофаги використовували для лікування деяких бактерійних захворювань людини. Інтерес до них впав після відкриття антибіотиків, проте знову відродився з появою стійких до антибіотиків штамів бактерій.

- **Віруси як протиракові агенти.** Проходять дослідження по обробці злоякісних пухлин генетично модифікованими штамми вірусів, таких як вірус простого герпесу і вірус коров'ячої віспи. Ці штами модифіковані таким чином, що вони специфічно заражають і руйнують клітини пухлини, і не здатні заражати нормальні клітини.

- **Віруси як вектори для генної інженерії.** Віруси, такі як певні бакуловіруси і аденовіруси, використовують в якості векторів для вбудовування генів в клітини тварин, що ростуть в культурі. Цю технологію використовують для включення генів, які кодують корисні білки, такі як компоненти вірусних вакцин, в культуру клітин.

- **Віруси як вектори в терапії генетичних захворювань.** Діти з важким комбінованим імунodefіцитом успішно лікуються з використання ретровірусу як вектору для вбудовування в стовбурові клітини немутантних копій генів, які мутували і стали причиною захворювання.

Предмет вірусології, її місце серед біологічних наук

Вірусологія — наука про віруси — мікроскопічні надмолекулярні структури, які є інфекційними агентами.

Виникнувши у кінці XIX століття як гілка патології людини і тварин, з одного боку, і фітопатології — з іншого, вірусологія стала самостійною наукою, що займає одне з основних місць серед біологічних наук.

Загальна вірусологія вивчає природу вірусів, їх будову, реплікацію, біохімію, генетику. Медична, ветеринарна і сільськогосподарська вірусологія досліджують патогенні віруси, їх інфекційні властивості, розробляє заходи попередження, діагностики і лікування захворювань, що викликаються ними.

Вірусологія вирішує фундаментальні і прикладні задачі і тісно пов'язана з іншими науками. Відкриття і вивчення вірусів, зокрема бактеріофагів, внесло величезний вклад в становлення і розвиток молекулярної біології. З молекулярною біологією також тісно пов'язані питання реплікації вірусів. Розділ вірусології, що вивчає спадкові властивості вірусів, тісно пов'язаний з молекулярною генетикою. Віруси є не лише об'єктом вивчення, але і інструментом молекулярно-генетичних досліджень, що зв'язує вірусологію з генетичною інженерією. Віруси — збудники великої кількості інфекційних захворювань людини, тварин, рос-

лин, комах. З цієї точки зору вірусологія тісно пов'язана з медициною, ветеринарією, фітопатологією і іншими науками.

Об'єктом досліджень у вірусології є не лише віруси. Ряд нещодавно виявлених інфекційних агентів має властивості, ближчі до вірусів, ніж до живих організмів. З цієї причини вони також розглядаються як об'єкт вірусології. До цих інфекційних агентів належать віроїди, вірусоїди і пріони. Віроїди – дуже своєрідні інфекційні агенти, що викликають захворювання у рослин і являють собою кільцеву молекулу РНК. Вірусоїди подібні віроїдам і є кільцевими РНК, позбавленими білкової оболонки. Проте, на відміну від віроїдів, для реплікації їм потрібний вірус-помічник. Пріони – це білкові інфекційні частки, що викликають захворювання людини і тварин.

Глава 1. Що таке віруси?

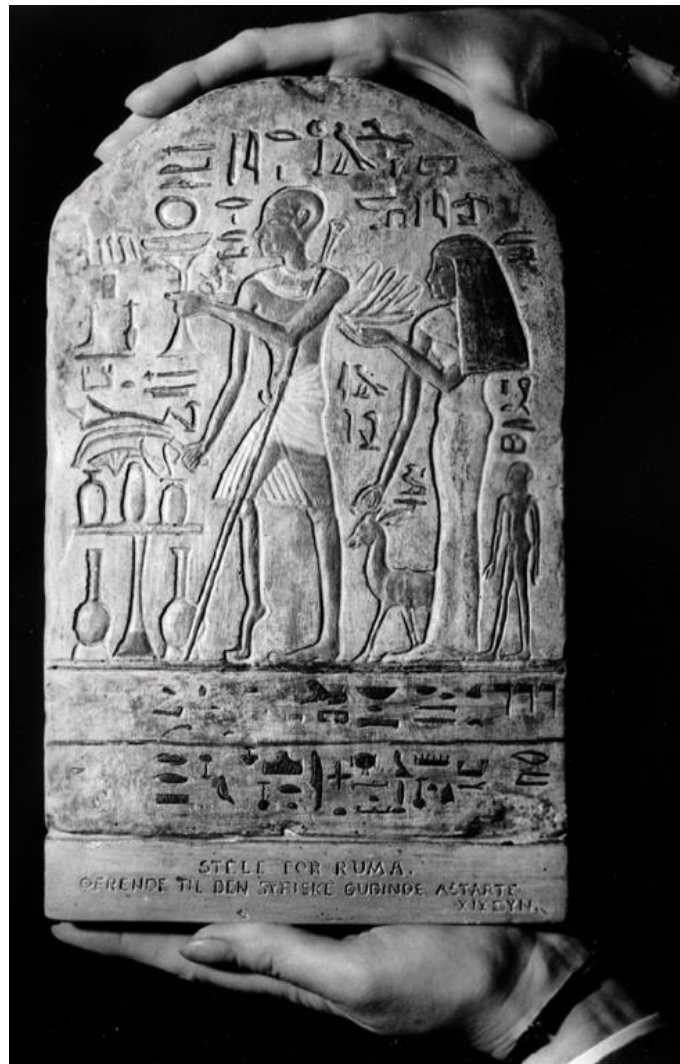
1.1. Історія розвитку вірусології.

1.1.1. Коротка передісторія

- 1.1. Історія розвитку вірусології
- 1.1.1. Коротка передісторія
- 1.1.2. Відкриття вірусів
- 1.1.3. Основні етапи розвитку вірусології
- 1.2. Природа вірусів
- 1.2.1. Чи є віруси живими

Вірусні хвороби людини, тварин і рослин були відомі задовго до того, як були відкриті власне віруси або взагалі був встановлений факт, що інфекційні хвороби викликаються збудниками. Найдавніші свідчення про вірусні хвороби відомі для захворювань людей. Ймовірно, найбільш давнім зображенням вірусної хвороби є старосипетська стела, на якій вочевидь зображений хворий на поліомієліт (мал.

1.1). Поліомієлітом страждав також фараон Сиптах, який помер у молодому віці близько 1187 р. до н. е. Вивчення його мумії, знайденої в 1905 році, виявило, що ліва нога була всохлою і мала інші ознаки хвороби.



Мал. 1.1. Старосипетська стела, знайдена при розкопках в Мемфісі і датована приблизно 2000 роком до н.е. (за іншими даними – 3700 р. до н.е.), на якій зображений жрець, хворий на поліомієліт, з властивими цій хворобі видимими симптомами, передусім атрофією кінцівки. Зміст цього рельєфу – звернення хворого до богів з проханням про послання зцілення. Про це говорять священна чаша в руках хворого і жертвна тварина, яку веде слідом за ним дружина.

У старогрецьких папірусах є згадки про віспу. Найбільш надійним доказом існування віспи в Стародавньому Єгипті є типові віспяні виразки, які були знайдені на шкірі мумії фараона Рамзеса V, що помер від віспи в 1143 (1145?) році до н.е. (мал. 1.2). Вірус віспи, як припускають, в давнину був занесений з Африки і Близького Сходу в Китай і Індію, де віспа залишалася ендемічним захворюванням.



Мал. 1.2. Голова мумії фараона Рамзеса V, який помер імовірно від віспи в 1145 (1143?) році до н. е.

Ще одне вірусне захворювання людей і собак, сказ, було згадане в працях старогрецького філософа Аристотеля (384 – 322 рр. до н. е.), який вказував на зв'язок сказу з укусами собак. Давньоримський філософ і лікар Цельс (бл. 25 р. до н. е. – бл. 50 р. н. е.) уперше детально описав сказ, і перший назвав це захворювання гідрофобією (водобоязню).

Ймовірно, найбільш страхотливою вірусною інфекцією минулого була віспа, що називається також натуральною віспою або чорною віспою. Потрапивши з Китаю і Індії в Європу, віспа в XVII – XVIII століттях щорічно призводила до загибелі сотень тисяч людей. Середньовічні лікарі були безпорадними у боротьбі з віспою.

Попри те, що люди не знали і не розуміли причин інфекційних хвороб і пов'язували їх з гнівом богів або підступами демонів, спостережливість людини дозволила зробити деякі

правильні висновки. Древні лікарі помітили, що люди, які перехворіли віспою, повторно не заражаються. На цьому спостереженні вони створили перший метод запобігання зараженню віспою, який надалі дістав назву **варіоляції**. Суть варіоляції полягала в тому, що вміст пустул від пацієнтів, що хворіли на легку форму віспи, вносили в маленьку ранку на шкірі людини, що викликало легке захворювання і попереджало важку форму. Термін варіоляція є похідним від латинської назви віспи — Variola. Цей метод був відомий на Сході принаймні з раннього Середньовіччя: в Індії про неї збереглися записи VIII століття, а в Китаї — X століття.

У Європу ця методика була уперше привезена з Туреччини дружиною британського посла в Константинополі Мері Вортлі Монтегю в 1718 році, яка, дізнавшись про варіоляцію у турок, прищепила свого шестирічного сина. У Англії, після дослідів над злочинцями і дітьми з церковних притулків, віспа була щеплена сім'ї британського короля Георга I. У перші 8 років в Англії віспа була щеплена 845 людям, з яких 17 не винесли її і померли, тобто варіоляція давала 2% смертності. Позаяк натуральна віспа призводила до смертності в 10 — 20 разів більше, то варіоляція користувалася спочатку широкою популярністю. Проте оскільки вона іноді таки призводила до смерті прищеплених від віспи і часто сама викликала епідемії, то поступово вона вийшла із вживання. Варіоляція була заборонена у Франції актом парламенту в 1762 р., але в Англії проіснувала до 1840 р.

Переворот у боротьбі з віспою вчинив англійський лікар Едвард Дженер. Ще у молодому віці Дженер узнав фермерське повір'я, що доярки, які перехворіли коров'ячою віспою, виявлялися згодом несприйнятливі до віспи натуральної. У 1765 р. лікарі Суттон і Фьюстер повідомили лондонське медичне товариство, що віспа у дійних корів, якщо нею заражається людина, оберігає її від захворювання натуральною людською віспою. Лондонське медичне товариство не погодилося з ними, визнало їх спостереження простою випадковістю, яка не заслуговує на подальші дослідження. У 1768 епідемія віспи в Англії знову пробудила інтерес Дженера до цього феномену, і він зробив дослідження з метою перевірки повір'я фермерів. У 1789 і 1790 рр. він зробив щеплення коров'ячої віспи своєму синові і його годувальниці — і коли результати виявилися позитивними, звернувся до колег в західних графствах Англії по допомогу щодо перевірки цього експерименту, але не отримав підтримки. Впродовж наступних років він продовжував експерименти з щепленнями коров'ячої віспи і 14 травня 1796, отримавши згоду батьків хлопчика, Дженер зробив щеплення проти віспи Джеймсу Фіпсу з Берклі, скориставшись матеріалом з рани не корови, а жінки, зараженої коров'ячою віспою. Через 2 тижні дитина, що ніколи раніше не хворіла на натуральну віспу, видужала, і 1 липня 1796 дослідник прищепив йому натуральну «людську» віспу, але захворювання не сталося. Результати своїх експериментів дослідник виклав в статті, представленій 10 липня 1798 р. Королівському науковому товариству, проте вона була знехтувана за недостатністю доказів. Дженер продовжив свої досліді і в 1798 р. опублікував 64-сторінкову монографію «Дослідження причин і дії коров'ячої віспи», а в подальші роки ще три книги з тієї ж тематики.

У 1800 р. вакцинація була визнана обов'язковою в англійській армії і на флоті, і з цієї миті щеплення від віспи почали ставати обов'язковими у багатьох країнах світу. У 1980 році ООН оголосила про повну ліквідацію натуральної віспи на Землі.

Термін **вакцинація** запропонував Луї Пастер з урахуванням того, що перша вакцина являла собою, власне кажучи, коров'ячу форму віспи, а корова має латинську назву Vacca.

Вірусні захворювання рослин поширені так само широко, як і захворювання людини і

тварин, але з цілком зрозумілих причин вони привертали меншу увагу. Мабуть, перша відома згадка про вірусну хворобу рослини зустрічається у вірші зі збірки японської лірики VIII століття «Манйосю» («Збірка міриад листя») і написана імператрицею Кокен влітку 752 року. У дуже довільному викладі рядки японської імператриці є приблизно такими:

*У цьому селі
Невже увесь час були приморозки?
У рослин, які я бачила
Влітку в полі
Було пожовкле листя.*

Рослини, про які йде мова, в японському оригіналі названі точно і є *Eupatorium lindleyanum*, або сідач Ліндлея. Ця рослина сприйнятлива до вірусу кучерявості листя тютюну, який і викликає пожовтіння ураженого листя сідача.

У Західній Європі, в першій третині XVII століття, було виконано багато картин і малюнків тюльпанів, на яких були зображені рослини з симптомами ураження вірусом мозаїки (мал. 1.3). При цій хворобі зазвичай однотонні квітки тюльпана раптом різко змінювались і ставали рябими, строкатими. Ця ознака вважалася сортовою, і цибулини таких рослин в період «тюльпаноманії» (1600-1637 рр.) в Голландії цінувались дуже дорого: в 1635 році одна цибулина могла коштувати до 6000 голландських гульденів. Досвідчений ремісник у той час отримував до 300 гульденів в рік.



Мал. 1.3. Малюнок тюльпана, ураженого вірусом мозаїки. Бальтазар ван дер Аст, 1620-і рр.

1.1.2. Відкриття вірусів

До кінця 18 – початку 19 віків вже було добре відомо, що багато захворювань є інфекційними і можуть передаватися від хворого здоровому. Впродовж 19 століття було ідентифіковано багато збудників хвороб тварин, людини і рослин. На кінець сторіччя успіхи багато в чому були пов'язані з роботами Луї Пастера і Роберта Коха. Зокрема, Кох сформулював знамениті постулати, які використовували для доказу, що мікроорганізм є збудником певної хвороби людини або тварини:

1. Мікроорганізм постійно зустрічається в організмі хворих людей (чи тварин) і відсутній у здорових;
2. Мікроорганізм має бути виділений з хворої людини або тварини і вирощений в чистій культурі;
3. При зараженні чистою культурою мікроорганізму здорова людина (чи тварина) захворює;
4. Мікроорганізм має бути повторно виділений з експериментально зараженої тварини або людини.

Перші три постулати відомі також як тріада Коха.

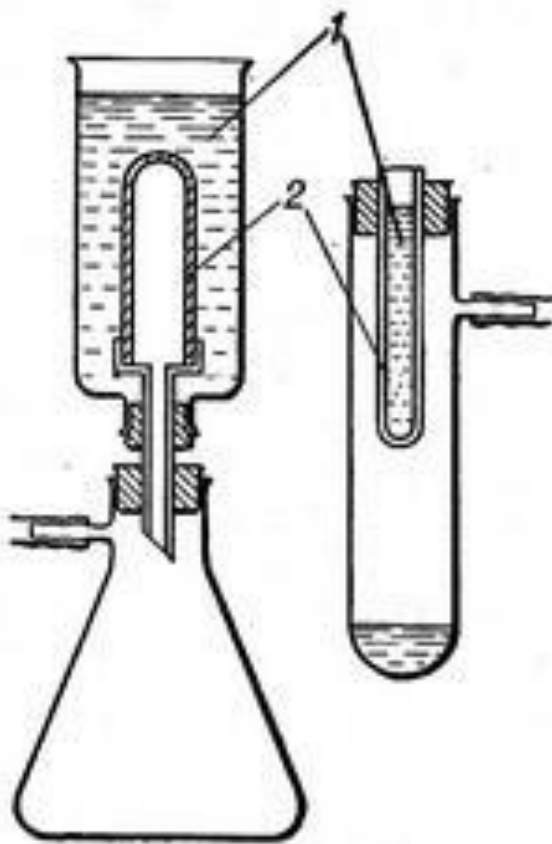
Проте на кінець 19-го століття з'ясувалося, що низка захворювань людини, таких як сказ, віспа, грип, жовта лихоманка є інфекційними, проте їх збудники не виявлялися бактеріологічними методами. У 1890 р. на X конгресі гігієністів Р. Кох вимушений був заявити, що «при перерахованих хворобах ми маємо справу не з бактеріями, а з організованими збудниками, які належать до зовсім іншої групи мікроорганізмів». Таким чином, була сформульована думка про існування групи збудників інфекційних захворювань небактеріальної природи. Залишалося експериментально довести їх існування.

Успіх був досягнутий не в царині інфекційних хвороб людини і тварин, а в галузі інфекційних хвороб рослин, тобто у фітопатології. Посадкам тютюну значної шкоди завдавало захворювання, що викликало мозаїчність листя. У 1886 р. німецький вчений Адольф Майер, що працював в Голландії, показав, що сік рослин, хворих на мозаїчну хворобу, при інокуляції викликає у здорових рослин таке ж захворювання.

В цей же час мозаїчною хворобою тютюну займалися вчені Російської імперії, серед яких був Дмитро Йосипович Івановський. Працюючи у Микитському ботанічному саду, Івановський показав, що сік хворих рослин тютюну, пропущений через свічку Шамберлана (мал. 1.4), яка затримувала усі відомі бактерії, залишається інфекційним. Прогрівання соку при 60–70 °С позбавляло його інфекційності, що свідчило про біологічну природу збудника. Результати роботи Д.Й. Івановського були опубліковані в книзі «Про дві хвороби тютюну» в 1892 році. Цей рік і вважається роком відкриття вірусів. Проте сам Івановський вважав, що збудник є бактерією, тільки дуже маленькою, і назвав такий тип збудників «бактерії, що фільтруються».

У 1898 році голландець Мартін Бейерінк повторив експерименти по фільтрації екстрактів з рослин тютюну, які були уражені мозаїкою. Як і Івановський, Бейерінк показав, що фільтрація не допомагає утримати збудника захворювання тютюнової мозаїки на керамічних фільтрах, які мали найменші на той час пори і вважалися стандартом для ультрафільтрації розчинів від бактерійних організмів. Бейерінк також показав, що патоген здатний репродукуватися і поширюватися в клітинах хазяїна, але не може бути культивований в розчині подібно до бактерій. На відміну від Івановського, який продовжував вважати, що тютюнова мозаїка викликається або некультивованою бактерією дуже малих розмірів, або її

токсинами, Бейерінк уперше ввів поняття **вірус** для позначення особливої, небактерійної природи збудника. Бейерінк вважав, що вірус є якоюсь рідкою матерією і називав вірусний розчин *contagium vivum fluidum* – заразною живою рідиною. Слід зазначити, що Бейерінк визнавав пріоритет Івановського у факті відкриття вірусів.

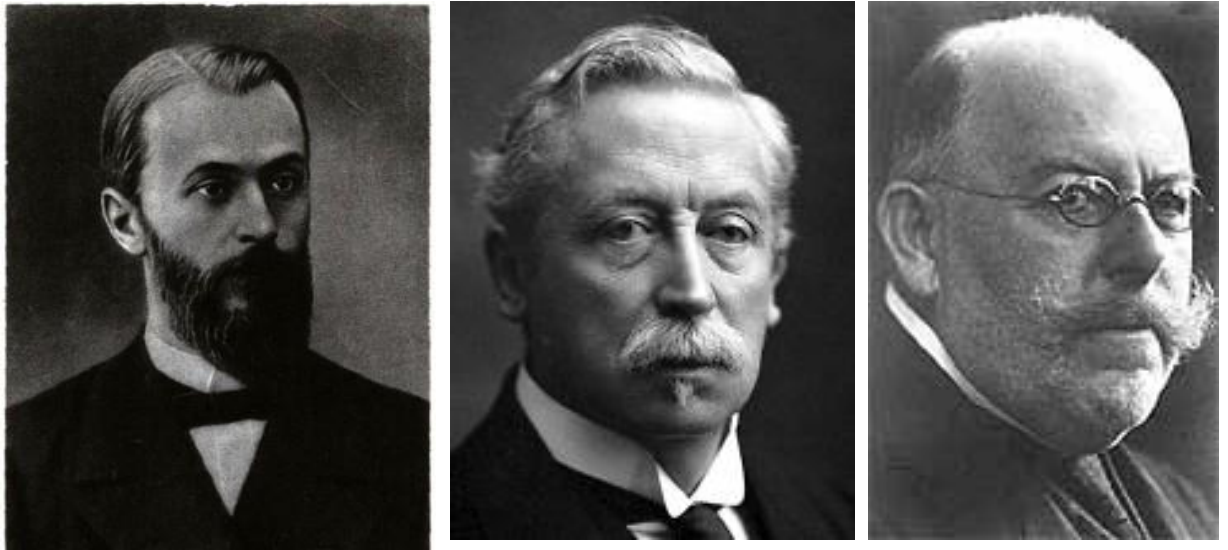


Мал. 1.4. Свічка Шамберлана. 1 - фільтрована рідина, 2 - свічка. Шарль Едуард Шамберлан (Ch. E. Chamberland, 1851-1908) французький бактеріолог, друг і учень Луї Пастера, виготовляв «свічки» з фарфору з дуже маленькими порами, що не пропускають бактерій.

Кажучи про відкриття вірусів, поряд Д.Й. Івановським і М. Бейерінком слід також поставити німецького бактеріолога Фрідріха Леффлера, який у 1898 році відкрив вірус ящуру. Працюючи разом з Паулем Фрошем, Леффлер виявив, що збудник ящуру фільтрується крізь фільтр Шамберлана. Але цей збудник не фільтрувався скрізь фільтр Кітасато (Kitasato), якій мав менші пори. На основі цих експериментів Леффлер зробив вірний висновок, що вірус ящуру є корпускулярною частинкою, а не рідиною, як вважав Бейерінк.

Таким чином, честь бути основоположниками вірусології належить трьом дослідникам – росіянинові Дмитру Івановському, що відкрив здатність збудника мозаїки тютюну проходити через бактерійні фільтри, голландцю Мартіну Бейерінку, що показав небактерійну природу збудника цієї хвороби і запропонував назву вірус, і німцю Фрідріху Леффлеру, який показав, що віруси не є рідиною, а мають корпускулярну природу.

Латинське слово вірус (*virus*) означає отрута. Треба сказати, що на початку і середині 19 віків терміни «вірус» і «бактерія» використовували практично як синоніми; вірусом могли називати будь-який хвороботворний агент. Тільки після того, як стала зрозуміла природа бактерій, грибів, отрут і токсинів, термінами «ультравірус», а надалі просто «вірус» стали означати новий тип збудника, що фільтрується. Остаточню термін «вірус» укорінився в 30-і роки XX століття.



Мал. 1.5. Основоположники вірусології (зліва направо): Івановський Дмитро Йосипович (1864 – 1920), Бейерінк Мартін Віллем (1851 - 1931), Леффлер Фрідріх Август Йоганн (1852 – 1915).

1.1.3. Основні етапи розвитку вірусології

Подальша історія досягнень вірусології безпосередньо пов'язана з успіхами розвитку методичної бази досліджень. Історія розвитку вірусології – невичерпна тема, яку неможливо вмістити у декілька сторінок. Нижче тільки перелічені деякі етапи, які зіграли визначну роль у становленні цієї науки.

У кінці XIX – початку XX ст. основним методом ідентифікації вірусів був метод фільтрації через бактерійні фільтри (свічки Шамберлана), які використовувалися як засіб розділення збудників на бактерії і небактерії. З використанням здатності до фільтрації через бактеріологічні фільтри в цей час були відкриті ціла низка вірусів :

1892 р. — вірус тютюнової мозаїки	1898 р. — вірус ящуру
1899 р. — вірус чуми рогатої худоби	1900 р. — вірус жовтої лихоманки
1902 р. — вірус віспи птахів і овець	1903 р. — вірус сказу
1904 р. — вірус віспи людини	1905 р. — вірус чуми собак
1907 р. — вірус лихоманки денге	1909 р. — вірус поліомієліту
1911 р. — вірус саркоми Рауса	1915 р. — віруси бактерій (бактеріофаги)
1916 р. — вірус кору	1917 р. — вірус простого герпесу
1926 р. — вірус везикулярного стоматиту	1931 р. — вірус грипу свиней

У 1911 році американський патолог Френсіс Раус довів вірусну природу злоякісної пухлини курей – саркоми Рауса.

У 1915 р. англійський бактеріолог Ф. Туорт, вивчаючи причини лізису бактерійних колоній, описав принцип передачі «лізису» новим культурам у ряді поколінь. Через два роки, в 1917 р., канадський бактеріолог Ф. д'Ерель повторно виявив явище лізису бактерій, пов'язаного з агентом, що фільтрується, і назвав цей агент бактеріофагом. Дослідження М. Барнета, що працював в Мельбурні в 1924-34 рр., показали широку різноманітність бактерійних вірусів за фізичними і біологічними властивостями. Відкриття різноманітності бактеріофагів викликало великий науковий інтерес, і у кінці 1930-х років троє дослідників — фізик М. Дельбрюк, бактеріологи С. Лурія і А. Херші, які працювали в США, створили неформальну «фагову групу», дослідження якої в області генетики бактеріофагів зрештою стали одним з наріжних каменів у фундаменті нової науки — молекулярній біології.

Значну проблему при роботі з вірусами становила неможливість їх культивування поза

живою клітиною, в чистих культурах. У 1930-і роки основним вірусологічним методом, використовуваним для виділення вірусів людей і тварин і їх подальшої ідентифікації, були лабораторні тварини (білі миші — для вірусів грипу, новонароджені миші — для вірусів Коксакі, шимпанзе — для вірусу гепатиту В, кури, голуби — для онкогенних вірусів, поросята — для кишкових вірусів тощо). Першим, хто почав систематично використовувати лабораторних тварин при вивченні вірусів, був Луї Пастер, який ще в 1881 р. проводив дослідження по інокуляції матеріалу від хворих сказом в мозок кролика. У роботах по вивченню жовтої лихоманки у вірусологічній практиці використовували новонароджених мишей.

У 1931 р. в якості експериментальної моделі для виділення вірусів стали використовувати курячі ембріони, які мають високу чутливість до вірусів грипу, віспи, лейкозу, саркоми курей і деяких інших вірусів. Нині курячі ембріони широко використовують для виділення вірусів грипу.

У 1932 р. англійський хімік В. Елфорд створює штучні дрібнопористі колоїдні мембрани — основу для методу ультрафільтрації, за допомогою якого стало можливим проводити визначення розміру вірусних часток і диференціювати віруси за цією ознакою.

У 1935 році американський біохімік У. Стенлі вперше отримав чистий препарат вірусу тютюнової мозаїки у вигляді кристалічного білку. Оскільки приготованим з кристалів розчином білку можна було заразити рослини, Стенлі зробив висновок, що віруси складаються з білку.

У 1937 році англійські біохіміки Ф. Боуден і Н. Пірі знайшли помилку у визначенні У. Стенлі і встановили, що на 94% вірус тютюнової мозаїки складався з білку, а на 6% — з нуклеїнової кислоти. Таким чином, було встановлено, що вірус насправді є нуклеопротеїном.

У 1939 р. для вивчення вірусів уперше був застосований електронний мікроскоп, що започаткувало вивчення структури віріонів.

У 1949 р. була відкрита можливість культивування клітин тваринних тканин в штучних умовах, що надалі дозволило використати культури клітин тварин з метою культивування вірусів. Введення у вірусологію методу культури клітин стало важливою подією, що дала можливість отримання багатьох вакцин. З широко вживаних нині культуральних живих і убитих вакцин, створених на основі атенуйованих (послаблених) штамів вірусів, слід зазначити вакцини проти поліомієліту, паротиту, кору і краснухи.

У 1949 Р. Маркхем і К.М. Смит виявили, що у препараті вірусу жовтої мозаїки турнепсу є два типи ідентичних сферичних частинок; один тип містив нуклеїнову кислоту, інший — ні. При цьому інфекційними були тільки частинки з нуклеїновою кислотою.

У 1948–1949 рр. А. Херші і Р. Ротман побудували першу генетичну карту бактеріофага Т2.

У 1952 році А. Херші і М. Чейз виявили, що для зараження бактеріальної клітини бактеріофагом достатньо, щоби в бактерію проникла ДНК бактеріофага.

У 1952 р. американський вірусолог і фітопатолог К. Мараморош показав здатність вірусів рослин розмножуватися у своєму переноснику — комасі.

У 1956 р. А. Гірер і Г. Шрамм, а також Х. Френкель-Конрат встановили, що генетичним матеріалом вірусу тютюнової мозаїки є РНК.

У 1971 році було встановлено, що деякі хвороби рослин, збудниками яких вважали віруси, насправді викликаються віроїдами. Віроїди відкрив і дав назву американський фітопатолог Теодор Дінер.

У 1960–80-і роки активно проводилося вивчення етіології захворювань, що викликаються пріонами. Американський лікар Стенлі Прузинер встановив, що інфекційний агент є білком і не містить нуклеїнових кислот.

У 1983 р. був відкритий вірус імунодефіциту людини.

У 2002 році в Нью-йоркському університеті був створений перший синтетичний вірус (вірус поліомієліту).

Починаючи з 1960-х років ХХ століття розвиток вірусології тісно пов'язаний з молекулярною біологією. Жодне відкриття молекулярної біології не обходилося без вірусної моделі. Зокрема, вивчення експресії генів у вірусів еукаріот дало фундаментальну інформацію про молекулярну біологію самих еукаріот — існування кеп-структури мРНК і її роль в трансляції РНК, наявність поліаденілової послідовності на 3'-кінці мРНК, сплайсинг і роль енхансерів в транскрипції уперше виявлені саме при вивченні вірусів тварин.

Вивчення вірусів зіграло найважливішу роль в розвитку епідеміології, імунології, молекулярної генетики і інших розділів біології. У різні роки як мінімум шість Нобелівських премій по фізіології і медицині і три Нобелівські премії по хімії були вручені за дослідження, безпосередньо пов'язані з вивченням вірусів.

1.2. Природа вірусів

Уявлення про природу вірусів змінювалися з розвитком вірусології. Оскільки збудник тютюнової мозаїки фільтрувався через бактерійний фільтр, Дмитро Івановський зробив висновок, що він є або дуже маленькою бактерією, або бактерійним токсином. На підставі того, що цей збудник не лише проходить через бактерійний фільтр, але і здатний дифундувати в товщу агарового гелю, Мартін Бейеринк припустив, що він має не бактерійну, а нову природу, є рідиною, і запропонував термін «вірус». Фрідріх Леффлер далі показав корпускулярну природу вірусів, тобто те, що вони є мікроскопічними частками, досить маленькими для того, щоб проходити через бактерійний фільтр Шамберлана і дифундувати в агаровому гелі. Більше нічого нового про природу вірусів учені не могли сказати впродовж трьох десятиліть.

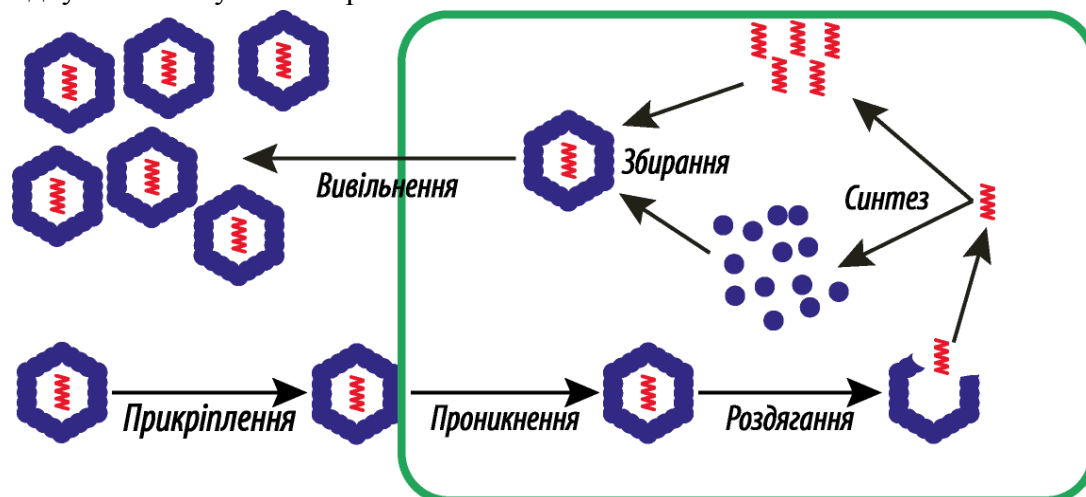
Тільки у 1930-х роках англієць Вільям Елфорд, працюючи з градуйованими колоїдними мембранами, встановив, що розмір вірусних часток знаходиться в межах 20-200 нм. Остаточне з'ясування морфології вірусних часток виявилось можливим після застосування електронного мікроскопа, який уперше був використаний для вивчення вірусів в 1939 році.

Уявлення про природу вірусів драматично змінилися в 1935 році, коли американський біохімік У. Стенлі уперше отримав чистий препарат вірусу тютюнової мозаїки у вигляді кристалічного білку. Оскільки приготувані з кристалів білку розчином можна було заразити рослини, Стенлі зробив висновок, що віруси складаються з білку. Це відкриття привело до уявлення, що віруси фактично є не живими організмами, а радше хімічними об'єктами.

Через рік англійські біохіміки Ф. Боуден і Н. Пири знайшли помилку у визначенні Стенлі і встановили, що на 94% вірус тютюнової мозаїки складається з білку, а на 6% — з нуклеїнової кислоти. Таким чином, було показано, що вірус насправді є нуклеопротеїном, що містить РНК. Далі було встановлено, що віруси можуть містити не лише РНК, але і ДНК, і що саме нуклеїнові кислоти вірусів, а не білки, обумовлюють їх інфекційність.

Надалі, з розвитком молекулярної біології, відкриттям процесів транскрипції і трансляції, цикли реплікації вірусів стали ясними (мал. 1.6). Зокрема, стало зрозуміло, що віруси є не просто інфекційними агентами, а паразитами, якщо можна так виразитися, на молекулярному рівні, оскільки для синтезу своїх нуклеїнових кислот і білків вони використовують

відповідну біохімічну машинерію клітини-хазяїна.



Мал. 1.6. Узагальнена схема циклу реплікації вірусів.

1.2.1. Чи є віруси живими?

Після робіт Стенлі по кристалізації вірусів у формі білкових кристалів не вщухає дискусія, чи можна вважати віруси живими організмами? Відповідь на це питання залежить від того, що саме ми вважаємо живим, тобто від того, як ми визначаємо поняття життя.

Що є життя?

Життя не є матеріальним об'єктом, вона не є ні силою, ні властивістю, яку можна виміряти. Поняття «життя» не має точного або загальноприйнятого визначення; представники різних наук намагаються визначати, що таке життя, зважаючи на ті або інші особливості живих об'єктів. Проте між фахівцями в цьому питанні консенсусу не досягнуто, жодне з пропонованих визначень живого не дозволяє однозначно і вичерпно розмежувати живу і неживу природу, і не є загальновизнаним. Фахівець з Університету Пітсбургу в США Е. Мэчери (E. Machery) у 2012 році написав статтю, заголовок якої є дуже знаменним: «Чому я перестав хвилюватися з приводу визначення поняття життя ... і чому ви теж повинні перестати», в якій показав неможливість або безглуздість спроб дати «точне» визначення життю.

Життя – це понятійний предмет, що складається із сукупності усіх живих організмів минулого, сьогодення і майбутнього. Усі живі організми мають властивість «бути живими», і поняття «життя» відповідає абстрактному, умоглядному уявленню про цю властивість. Замість даремних спроб визначити, що таке життя, раціональнішим є виділення класу живих об'єктів з використанням кластерного підходу. При такому підході визначається певний кластер (набір) властивостей, більшість з яких має бути присутньою в усіх членів класу, хоча окремі властивості можуть бути відсутніми у конкретних членів. Різні фахівці пропонують зазвичай набори властивостей, які вони вважають необхідними для живого об'єкту, що дещо розрізняються. Найчастіше до таких властивостей відносять наявність певних хімічних елементів (вуглець, азот, фосфор і так далі) або макромолекул типу нуклеїнових кислот і білків, клітинну будову, здібності рости і розвиватися через реалізацію генетичної програми, самовідтворюватися, відновлюватися при ушкодженнях, пристосовуватися до довкілля і реагувати на стимули довкілля, наявність метаболізму, обмін речовиною і енергією з оточенням, фенотипічна і генотипічна мінливість і так далі

Будь-який об'єкт, щоб вважатися живим, повинен мати більшість з цих властивостей, хоча і не обов'язково усі. Наприклад, насіння рослин, що покоїться, не має активного метаболізму, але безумовно відноситься до живих об'єктів.

Коли ми говоримо про життя, ми фактично говоримо про живі організми, які мають властивість бути живими. Проте що є організм? Простою відповіддю на це питання буде твердження, що організмами є живі об'єкти. Але така відповідь є недостатньою, наприклад тому що вона виключає існування мертвих організмів. Вдалішим буде твердження, що організмами є об'єкти, живі в певний момент їх існування. Пов'язане твердження, що усі живі об'єкти є організмами, буде невірним, оскільки органи, наприклад серце або печінка, як очевидно не є організмами, хоча вони є живими об'єктами. Таким чином, прирівнювання організму до живого об'єкту є невдалим; поняття живого об'єкту і організму слід розділити. Для того, щоб бути віднесеними до організмів, живі об'єкти повинні належати до репродуктивного ряду поколінь, що характеризуються життєвим циклом. З цієї причини органи не можуть розглядатися як організми, оскільки вони не відтворюють себе у ряді поколінь. Органи відтворюються при репродукції цілого організму, але у них немає життєвого циклу.

Крім того, щоб вважатися організмами, живі об'єкти повинні мати функціональну автономію, яка дозволяє їм контролювати самих себе і бути, принаймні частково, незалежними від інших організмів і довкілля. Таким чином, органи, тканини або, наприклад, листя рослин є живими об'єктами, але вони не є організмами.

Як очевидно із сказаного вище, такі об'єкти, як молекули ДНК або білку, а також внутрішньоклітинні органели типу рибосом не є ані живими об'єктами, ані організмами. Так само віруси, віроїди і тим більше пріони не є ані живими об'єктами, ані організмами; вони не мають більшості властивостей, які біологи вважають притаманними живим організмам, таких як здатність отримувати і запасати енергію, або обумовлена наявністю метаболічної активності автономність. Віруси не можуть самовідтворюватися, замість цього їх реплікує з використанням своєї метаболічної активності клітина, яку вони заразили. Таким чином, з боку вірусів їх відтворення є пасивним, а не активним, процесом.

Реплікація вірусів складається з процесів копіювання, які виконують певні компоненти клітин хазяїна. В протилежність цьому, живі клітини активно відтворюються не реплікацією, а в результаті процесу ділення. Віруси стають частиною живої системи тільки тоді, коли їх геном інтегрується в заражену клітину хазяїна, і вони є живими не більшою мірою, ніж інші клітинні компоненти, такі як гени, макромолекули або органели.

В зв'язку з цим М. ван Регенмортель (M. van Regenmortel M.) і Б. Махі (B. Mahy) пишуть (Додаткове читання до глави 1, [9], с. 8): «Віруси належать до біології, оскільки вони мають гени, реплікуються, еволюціонують і адаптуються до конкретних хазяїв, біотичних місць мешкання і екологічних ніш. Проте віруси не отримують і не зберігають вільну енергію, і не є функціонально активними поза клітинами їх хазяїв. Хоча вони є патогенами, віруси не слід розглядати як патогенні мікроорганізми, оскільки вони не є живими... Вони неживі інфекційні сутності».

Оскільки віруси не є живими, невдалим є вираз «життєвий цикл» стосовно вірусів. У них немає життєвого циклу. Значно доречнішими щодо вірусів є термін «цикл реплікації», який ми і будемо використовувати.

Іноді про віруси пишуть, що вони розташовані на межі між живим і неживим. Проте цей метафоричний вираз не має біологічного сенсу і фактично використовується замість фрази «Я не можу точно сказати». Бо хто дав визначення межі між живим і неживим, вказав її ознаки і пояснив, як її відшукати?

Так само невдалим є віднесення вірусів, віроїдів і пріонів до якогось царства живої природи «Vira», як це інколи робиться. Різні групи вірусів, вірогідно, мають різне походження; віруси і віроїди з одного боку і пріони з іншого боку не мають нічого спільного окрім того,

що вони викликають хвороби. Таким чином, їх розташування у єдиному «царстві» не має біологічних підстав. Можна було б погодитися, що віднесення цих об'єктів до якогось окремого царства зроблено тільки заради зручності, але, по-перше, не зрозуміло, у чому саме ця зручність полягає, а по-друге, воно вводить в оману читачів. До речі, Міжнародний комітет таксономії вірусів не виділяє у вірусів якихось царств, типів, відділів або класів.

Завершуючи обговорення питання, чи є віруси живими або ні, хотілося б зазначити наступне. Після того, як стали ясними цикли реплікації вірусів (мал.1.6), це питання втратило актуальність. Вважати віруси живими або ні – врешті-решт кому як до смаку. «Вірної» відповіді тут немає. І якщо деякі біологи наполягають на тому, що віруси, віроїди та пріони треба вважати живими організмами або деякою «неклітинною формою життя», а інші біологи категорично з цим незгодні, для розуміння основ вірусології це не має ніякого значення.

Продовжуючи обговорення природи вірусів, звернемо увагу ще на таку проблему: не слід плутати вірус з віріоном, позаклітинною вірусною часткою. Впродовж свого циклу реплікації вірус приймає різні форми, наприклад він може бути у вигляді вірусної частки поза клітиною хазяїна або у вигляді нуклеїнової кислоти, яка реплікується усередині клітини хазяїна (мал. 1.6). Такі характеристики, як розмір, форма, маса або хімічний склад вірус має тільки тоді, коли він представлений віріоном. Проте на інших стадіях циклу реплікації, наприклад коли ДНК вірусу вбудовується в хромосому хазяїна, ці характеристики втрачають сенс, і вірус набуває інших властивостей. Таким чином, характеристику вірусу не можна зводити тільки до фізичних і хімічних особливостей віріона. З цієї причини некоректними є вирази на кшталт «малюнок вірусу» або «очищення вірусу». Ця ситуація деякою мірою подібна, наприклад, такий, коли змішують поняття «комаха», яке включає декілька окремих стадій розвитку, з однією із стадій, наприклад з лялечкою, гусеницею або метеликом.

Хімічний склад або навіть послідовність амінокислот білку оболонки віріона не дають ніякої інформації стосовно інших важливих характеристик вірусу, пов'язаних з його взаємодією з клітиною хазяїна. Багато особливостей можна виявити тільки при взаємодії вірусу з клітиною. Наприклад, певні структурні елементи зовнішньої оболонки віріону можуть розпізнаватися рецептором клітини хазяїна, що дозволяє вірусу заражати хазяїна. Проте такий структурний елемент, що називається сайтом зв'язування рецептора, не є особливістю, яка властива тільки віріону і яку можна визначити незалежно від клітинного рецептора.

Що ж таке віруси?

Отже, віруси не є організмами і не є живими. Як їх можна визначити? Безумовно, віруси є біологічними сутностями. Їх віріони в загальному випадку представлені дуже дрібними частками і за рідкісним виключенням їх не видно у світловий мікроскоп. Віріони не є клітинами. Вони не містять органел, за винятком віріонів аренавірусів, які містять не функціональні рибосоми клітини-хазяїна, що упаковуються у віріон при збиранні вірусних часток. Розмір вірусів не є ознакою, яка однозначно їх відрізняє від живих організмів, – найбільші віруси мають розмір, що перевищує 1000 нм; в той же час деякі рикетсії мають клітини розміром 200×400 нм, мікоплазми і хламідії мають діаметр 150–350 нм. Таким чином, розмір віріонів великих вірусів перевищує розмір цих прокаріотичних паразитів.

Віруси мають геном, що містить гени. Геном усіх живих організмів представлений дволанцюговою ДНК, проте геном вірусів може являти собою як ДНК, так і РНК, причому нуклеїнова кислота може бути у одноланцюговій або дволанцюговій формі. У загальному випадку геном вірусів набагато менше генома живої клітини.

Віруси є паразитами. Віруси відрізняються від клітин способом репродукції. Нові клітини завжди виникають безпосередньо з передіснюючих клітин, але нові віріони вірусу ніколи не утворюються безпосередньо з передіснюючих віріонів. Нові віріони утворюються в процесі реплікації, який здійснюється усередині клітини-хазяїна і включає синтез компонентів віріона, за яким йде їх збирання в готовий віріон. Таким чином, віруси є паразитами клітин, які залежать від своїх хазяїв у більшості своїх потреб. Клітина надає вірусу будівельні блоки, такі як амінокислоти і нуклеотиди; механізми синтезу білку (рибосоми) і енергію у вигляді аденозинтрифосфату (АТФ).

Важко дати коротке точне визначення, що таке віруси. Деякі з визначень вірусів приведені на вставці нижче.

Вірус – це шматочок нуклеїнової кислоти, оточений поганими новинами.

З Нобелівської лекції сера Пітера Медавара, 1960 рік.

...Віруси можна розглядати як мобільні генетичні елементи, одягнені в захисну оболонку і здатні переходити з однієї клітини в іншу.

Нобелівський лауреат (1962) Д.Д. Вотсон

Вірус це вірус!

Нобелівський лауреат (1965) А. Львів

У міру розвитку вірусології, відкриття нових вірусів і нових властивостей вірусів, пропонувані визначення для вірусів змінюються. Ймовірно, як і у випадку поняття «життя», простіше перерахувати властивості, які дозволяють однозначно ідентифікувати об'єкт як вірус і при цьому відрізнити його від віроїдів, сателітних нуклеїнових кислот і пріонів. Використовуючи такий підхід, можна відмітити наступні особливості вірусів.

1. Віруси є внутрішньоклітинними облигатними інфекційними агентами, що не мають клітинної будови.
2. Поза живою клітиною віруси є комплектом з однієї або декількох молекул нуклеїнової кислоти, поміщених в захисну оболонку або оболонки з білку і ліпопротеїну.
3. Віруси можуть організувати свою реплікацію тільки усередині відповідних клітин хазяїв.
4. Реплікація вірусів зрештою зводиться до синтезу множинних копій їх білків і нуклеїнової кислоти, який повністю залежить від дії відповідних біохімічних систем клітини хазяїна і локалізується в сайтах, не відокремлених від вмісту клітини ліпопротеїновою мембраною.
5. Збирання нових вірусних часток відбувається за допомогою самозбирання (можливо при певній участі клітини хазяїна) наново синтезованих молекул нуклеїнової кислоти і білків вірусу.
6. Реплікація вірусів дає безперервний початок різним варіантам за допомогою змін в нуклеїновій кислоті.

Завершуючи цю главу, треба відмітити, що, ймовірно, все-таки найкращою відповіддю на питання, що таке вірус, є знамените визначення Нобелівського лауреата Андре Львова, який сказав так:

ВІРУС - ЦЕ ВІРУС!

Після вивчення цієї глави ви повинні:

- Вміти обговорити причини, які спонукають вивчення вірусів
- Знати історію відкриття вірусів
- Пояснити, що відрізняє віруси від живих організмів і що їх поєднує з живими організмами
- Дати визначення терміну «вірус»

Додаткове читання до глави 1.

1. Barlow C.C. From Gaia to selfish genes: Selected writings in the life sciences. - 1991.- Cambridge, MA: MIT Press. - 2777 p.
2. Boden M. A. Is metabolism necessary? // The British Journal for the Philosophy of Science - 1999.- V. 50, №2.- P. 231-248.
3. Cleland C.E. Life without definitions // Synthese.- 2012. - V.185, №1.- P. 125--144.
4. Cleland C.E., Chyba C.F. (2002). Defining 'life' // Orig. Life Evol. Biosph.- 2002.- V.32, №4.-P.387-393.
5. Diéguez A. Life as a homeostatic property cluster // Biol. Theory. - 2012. - DOI: 10.1007/s13752 - 012-0052-4
6. Machery E. Why I stopped worrying about the definition of life... and why you should as well // Synthese.- 2012. - V.185, №1.- P. 145-164.
7. Mayr E. This is biology: The science of the living world. - 1997.-Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press.- 327 p.
8. Pennock R.T. Negotiating boundaries in the definition of life: Wittgensteinian and Darwinian insights on resolving conceptual border conflicts // Synthese.- 2012. - V.185, №1.- P. 5--20.
9. van Regenmortel M.H., Mahy B.W. Emerging issues in virus taxonomy // Emerg. Infect. Dis.- 2004.-V.10, №1.-P.8-13.

Глава 2. Структура вірусної частки

- 1. Морфологія віріонів
- 1.2. Принципи структурної організації віріонів
- 1.3. Типи симетрії віріонів
- 1.4. Ліпідні мембрани у віріонах
- 2. Хімічний склад віріонів
- 2.1. Нуклеїнові кислоти
- 2.2. Білки
- 2.3. Інші компоненти віріонів

Позаклітинна форма вірусу — віріон — це структура, яка дуже добре пристосована для збереження і перенесення нуклеїнової кислоти від однієї клітини до іншої. Фактично віріон є системою доставки генів — він містить геном вірусу, і його функція полягає в захисті і забезпеченні входу генома в клітину, в якій він зможе реплікуватися і формувати нові віріони.

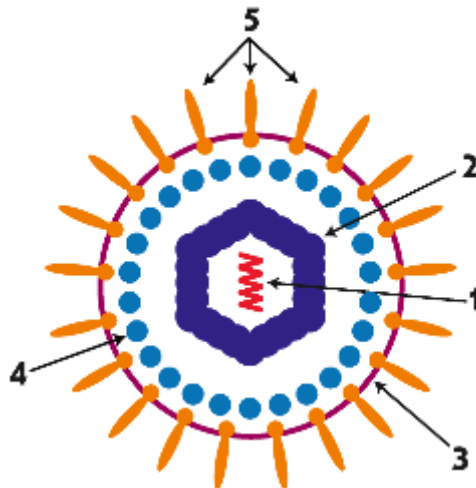
Вірусний геном пакується у білкову оболонку. Білки оболонки виконують важливі

функції:

- Захищають нуклеїнові кислоти від руйнування нуклеазами і механічних розривів.
- Мають елементи ідентифікації, які дозволяють вірусам розпізнавати придатну для зараження клітину (відсутні у вірусів рослин, які потрапляють в клітину через ушкодження або безпосереднім введенням).
- Мають систему вивільнення генома, яка гарантує, що вірусний геном буде вивільнений з віріона тільки у потрібному місці в потрібний час.

Окрім білкової оболонки, низка складніше влаштованих віріонів має ліпідний компонент, який є присутнім зазвичай на поверхні віріона і утворює ліпопротеїнову оболонку.

Схематичне узагальнене зображення структури віріона наведено на малюнку 2.1.



Малюнок 2.1. Схематичне зображення віріона. 1 - нуклеїнова кислота (геном вірусу); 2 - капсид (нуклеокапсид); 3 - ліпопротеїнова оболонка (суперкапсид, пеплос); 4 - білкові молекули матриксу; 5 - білкові вирости на оболонці (пепломери, «шипи»).

Усередині віріона знаходиться одна або декілька молекул нуклеїнової кислоти — геном вірусу. Геном оточений білковими молекулами, які формують зовнішній чохол або футляр, що утворює замкнуту оболонку навколо нуклеїнової кислоти, який зветься **капсидом** (від лат. capsa — вмістище, ящик). У багатьох вірусів, що мають прості віріони, ці два компоненти і складають зрілу вірусну частку.

У складніше влаштованих вірусів капсид оточений ліпопротеїновою мембраною, що формує оболонку навколо капсиду. Цю оболонку іноді називають **суперкапсид** або **пеплос**

(дв.-грец. *πέπλος, πέπλον*, лат. *perlum*, покрив). Простір між капсидом і ліпідною оболонкою може містити додаткові білкові молекули – білки *матриксу*. На білковій оболонці можуть бути присутніми помітні в електронний мікроскоп білкові вирости. Ці поверхневі вирости носять назву пепломери. Спочатку їх називали шипами. Проте вони виявилися не гострими і не жорсткими, тому слово «шип» до деякої міри водить в оману. Проте цей термін у вірусологічній літературі іноді використовується і нині.

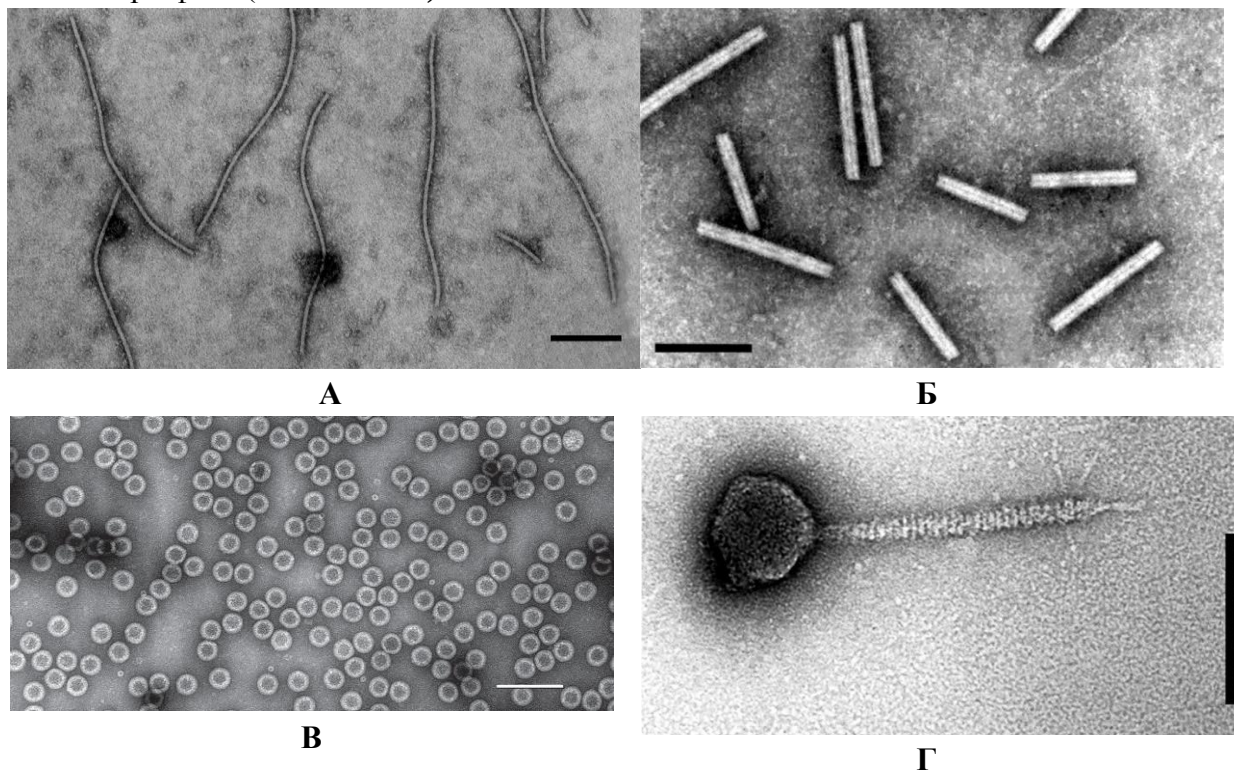
Капсиди просто і складно влаштованих віріонів можуть називати також *нуклеокапсидами* (нуклеїнова кислота + капсид).

При описі морфології віріонів використовують ще низку термінів, з якими слід ознайомитися. Капсиди складаються з *білкових субодиниць* — згорнутих певним чином поліпептидних ланцюгів. Субодиниці можуть складати *структурну одиницю* (структурний елемент) — білковий ансамбль більш високого порядку, утворений декількома пов'язаними ідентичними або неідентичними субодиницями.

На поверхні капсидів в електронному мікроскопі можуть бути помітними групи виступів (кластери), що зветься *морфологічними одиницями*. Часто спостерігаються кластери, що складаються з п'яти (пентамер) і шести (гексамер) виступів. Це явище дістало назву *пентамерно-гексамерної кластеризації*. Якщо морфологічна одиниця відповідає хімічно значущому утворенню (зберігає свою організацію в умовах м'якої дезінтеграції), то застосовують термін *капсомер* (лат. *capsa* – вмістище + грец. *μέρος* – частина).

2.1. Морфологія віріонів

Віріони мають дуже різноманітну форму. Вони можуть бути паличкоподібними, ниткоподібними, або мати вигляд правильних багатогранників. Віріони, оточені ліпопротеїновою оболонкою, можуть мати кулясту або неправильну форму. Складну будову віріона мають деякі бактеріофаги (малюнок 2.2).

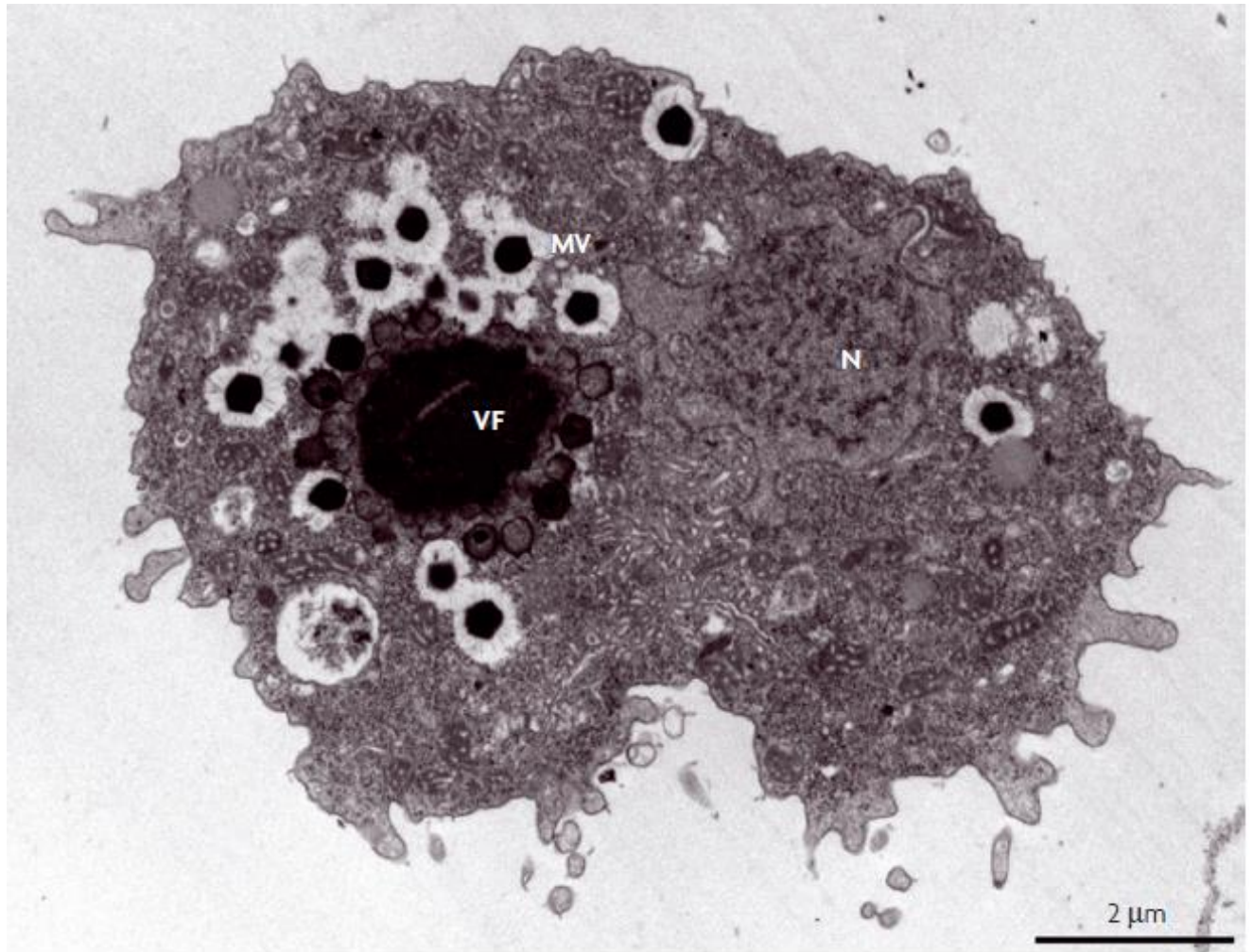


Малюнок 2.2. Електронні мікрофотографії віріонів, що мають різну морфологію. А – ниткоподібні віріони вірусу «віспи» (шарки) слив; Б – паличкоподібні віріони вірусу тютюнової мозаїки; В – округлі віріони РНК-вірусу лейшманій; Г – віріон бактеріофагу λ , що має морфологію «голівка-хвіст». Смужки на кожній мікрофотографії представляють 100 нм. Фотографії узяті з Дев'ятої доповіді Міжнародного комітету з таксономії вірусів.

Діаметр найменших віріонів складає близько 20 нм. До недавнього часу найбільшими віріонами вважали віріони вірусу натуральної віспи, що мають витягнуту форму з довгою віссю більш ніж 350 нм. Слід зазначити, що деякі ниткоподібні віруси рослин можуть мати довжину віріонів до 2000 нм (2 мкм), проте їх діаметр у край малий і вони залишаються невидимими у світловому мікроскопі.

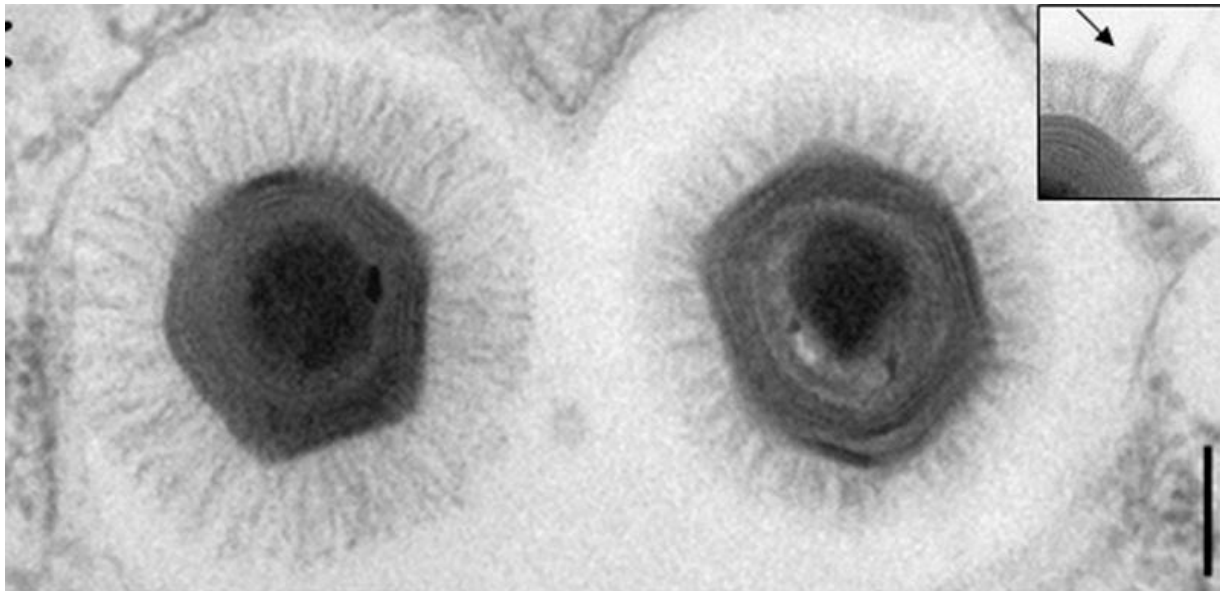
У 2003 році був відкритий вірус, який паразитує в амебі *Acanthamoeba polyphaga*. Спочатку його побачили ще в 1993 році, але він був прийнятий за бактерію. І тільки в 2003 році було встановлено, що це вірус. Цей вірус був названий мімівірусом, і його віріон має діаметр близько 400 нм (мал. 2.3).

У 2010 році був відкритий ще більший вірус, названий *Megavirus chilensis*. Мегавірус було знайдено в зразку води, узятому неподалік від узбережжя Чилі. Мегавірус вражає амеб роду *Acanthamoeba*. Діаметр віріона мегавірусу перевищує 440 нм (мал. 2.4).



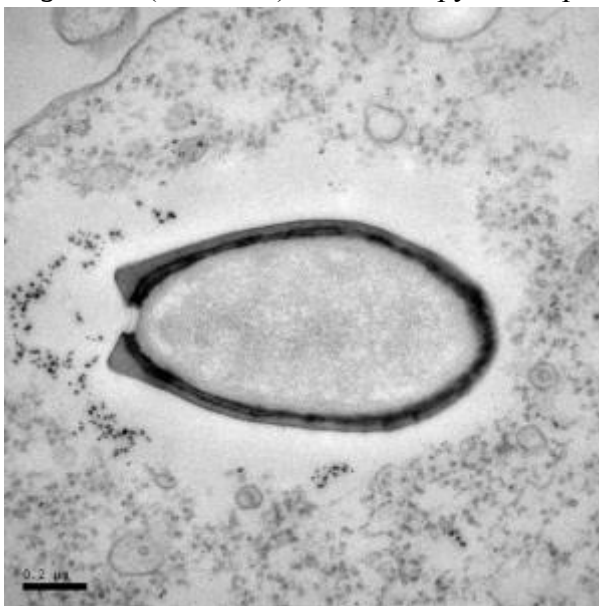
Малюнок 2.3. Амеба *Acanthamoeba polyphaga*, інфікована мімівірусом. N - ядро; VF – «вірусна фабрика» (місце синтезу макромолекул мімівірусу і збирання віріонів); MV - віріони мімівірусу. Трансмісивна електронна мікроскопія (за Raoult D., Forterre P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus // Nat. Rev. Microbiol.- 2008.- V6, №4. P.315-319.)

У 2013 році було виявлено рід гігантських вірусів з найбільшим геномом, що відомий для будь-якого вірусу. Цей рід отримав назву *Pandoravirus* і на цей час в ньому відомі два види – *P. salinus* і *P. dulcis*. Вони мають різні ареали – перший мешкає в Тихому океані біля гирла річки на чилійському узбережжі, другий — у прісноводному ставку в Австралії, недалеко від Мельбурна.

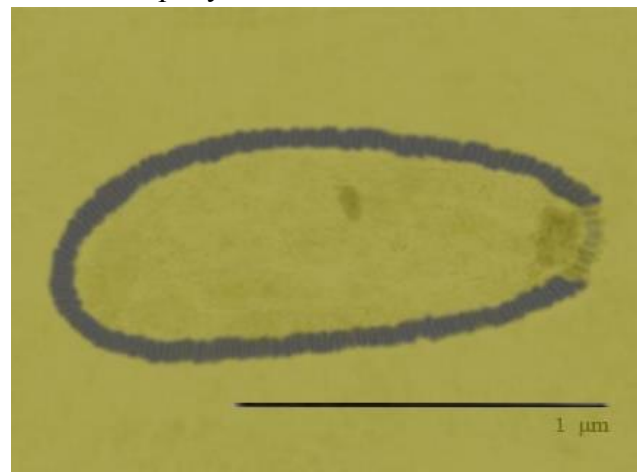


Малюнок 2.4. Віріони мімівірусу (ліворуч) і мегавірусу (праворуч) в одній вакуолі амеби (спільна інфекція). Стрілкою на врізанні показані пасма, які часто спостерігаються у зовнішньому волокнистому шарі віріону мегавірусів. Смужка представляє 200 нм. Трансмісивна електронна мікроскопія (за Arslan D., Legendre M., Seltzer V., Abergel C., Claverie J.M. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2011.- V. 108, №42.-P.17486-17491.)

Розмір цих вірусів близько 1 мкм, що майже вдвічі перевищує розміри *Mimivirus* і *Megavirus* (мал. 2.5a). Обидва віруси є паразитами амеб роду *Acanthamoeba*.



а



в

Малюнок 2.5. Віріони *Pandoravirus* (а) і *Pithovirus* (в).

Нарешті, у 2014 році був відкритий ще більший вірус, *Pithovirus*, найбільший з відомих на сьогодні вірусів. Він був отриманий зі зразка багаторічної мерзлоти з Сибіру, його вік оцінюється в 30 тис. років, причому після розморожування вірус виявився життєздатним. Вірус описали французькі еволюційні біологи Жан-Мішель Клаврі і Шанталь Абергел з Середземноморського університету (у складі Університету Екс-Марсель). Вони припустили, що пітовірус може бути ремнантом великої групи вірусів, що паразитували на організмах, які існували на ранніх етапах розвитку Землі. Пітовірус виявився здатним паразитувати на амебах, як і інші великі віруси.

Pithovirus має близько 1,5 мкм завдовжки і 0,5 мкм в діаметрі (мал.2.5в), що у півтора рази більше, ніж у пандоравірусу. Проте геном пітовірусу, хоча й досить великий, проте на порядок менший, ніж у пандоравірусів.

Таким чином, віріони вірусів у більшості випадків є субмікроскопічними частками. Проте найбільш великі віріони перевищують по розмірах клітини таких прокаріотичних організмів, як рикетсії або мікоплазми.

2.1.1. Принципи структурної організації віріонів

Принципи структурної організації вірусних часток визначаються тими властивостями, які повинен мати вірус. З одного боку, віріони повинні ефективно і безпомилково збиратися. З іншого боку, при проникненні в клітину-хазяїна вони повинні регульовано розбиратися.

Основним структурним компонентом віріонів є білковий капсид, в якому знаходиться нуклеїнова кислота. Ще в 1957 році Ф. Крик і Дж. Вотсон дійшли висновку, що капсиди вірусів мають бути побудовані з великої кількості ідентичних субодиниць білку. Вони звернули увагу, що геном вірусу занадто малий для того, щоб кодувати єдиний білок, здатний укрити нуклеїнову кислоту. Окрім цього, оскільки віруси у край економно використовують свій генетично матеріал, білки, що утворюють капсид, мають бути малі.

Необхідною фізичною умовою стабільності будь-якої структури, у тому числі капсиду, є те, що вона має бути в стані мінімуму вільної енергії. Для капсиду ця умова забезпечується тоді, коли між субодиницями білку формується максимальне число нековалентних взаємодій. Білкові субодиниці мають неправильну форму, тому максимальне число взаємодій білок-білок буде спостерігатися тільки при **симетричному** розташуванні білкових субодиниць; при цьому є обмежена кількість можливостей такої побудови. Інакше при одному і тому ж наборі амінокислотних бічних ланцюгів у білках виникали б різні системи нековалентних зв'язків в різних місцях, що призводило б до неоднозначностей при зборці і нестабільності утворюваної структури віріонів.

Існують два типи організації, при якій ідентичні асиметричні молекули можуть з'єднуватися одна з одною з утворенням симетричного капсиду: спіральна зборка і утворення замкнених білкових оболонок. Це призводить до утворення двох типів структур: паличкоподібних або ниткоподібних та сферичних, «ізометричних» (мал. 2.2). Кожен з цих типів структур утворюється білками капсидів в результаті процесу, що називається самозбиранням. Самозбирання відбувається тільки у тому випадку, якщо воно є енергетично вигідним. Це означає, що з усіх можливих форм капсиду реалізується лише та, яка має найменшу вільну енергію білків цього вірусу.

Капсиди будуються з білкових субодиниць, які збираються відповідно до відносно простих геометричних принципів. Саме тому капсиди абсолютно різних вірусів, наприклад бактеріофагів, вірусів тварин або вірусів рослин, можуть бути побудовані по одному плану і не розрізнятися за морфологією.

У паличкоподібних або ниткоподібних вірусних частках білкові субодиниці зв'язуються з нуклеїновою кислотою, розташовуючись уздовж неї періодичним чином так, що вона згортається в спіраль. Найбільш відомі приклади таких структур — віруси рослин, наприклад вірус тютюнової мозаїки (ВТМ). В ізометричних частках нуклеїнова кислота укладена таким чином, що спосіб її упаковки геометрично не пов'язаний з організацією оболонки. Таким чином, між спіральними і ізометричними структурами є важлива хімічна відмінність — регулярні періодичні взаємодії між капсидом і нуклеїновою кислотою в одному випадку

і істотно більш лабільні нековалентні зв'язки між чохлом і упакованою нуклеїновою кислотою в іншому.

Ще однією важливою властивістю віріонів є те, що хоча включення в них вірусної нуклеїнової кислоти здійснюється специфічно, в цілому воно не залежить від інформації, що знаходиться у більшій частині послідовності нуклеотидів. У випадку спіральних структур, наприклад ВТМ, кожна білкова субодиниця взаємодіє з певним числом нуклеотидів незалежно від їхньої послідовності, хоча при ініціації зборки, мабуть, відбувається переважне зв'язування з певною ділянкою. У випадку ізометричних часток конденсація молекули нуклеїнової кислоти також, ймовірно, не залежить від деталей її вторинної і третинної структури, хоча може залежати від послідовності нуклеотидів.

2.1.2. Типи симетрії віріонів

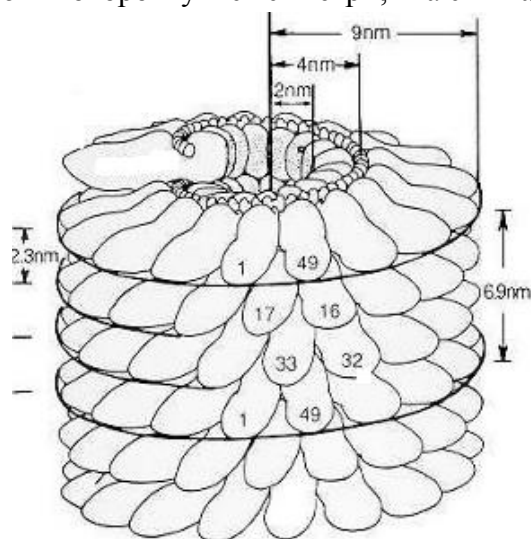
Паличко- і ниткоподібні віруси, а також ниткоподібні нуклеокапсиди багатьох вірусів, що володіють оболонкою, мають спіральну симетрію, а ізометричні віруси — ікосаедрічну симетрію. Часто у дуже великих вірусів симетрія маскується через наявність невеликих спотворень. Довгі ниткоподібні вірусні частки можуть бути гнучкими, а великі ізометричні не завжди мають строго сферичну симетрію.

Спіральна симетрія

Одним з простих способів побудувати симетричну фігуру з несиметричних компонентів є розміщення їх по колу з утворенням диска. Далі такі диски можуть накладатися один на одного, створюючи порожнистий циліндр. Проте дослідження вірусних часток показали, що у паличкоподібних віріонів завжди формуються структури не у вигляді дисків, а у вигляді спіралей. Цьому є очевидне пояснення — спіральна молекула нуклеїнової кислоти не може рівномірно зв'язуватися з білком в структурі з дисків. Проте при спіральній побудові формуватиметься максимальна кількість зв'язків, однакова для кожної субодиниці, окрім крайніх на обох кінцях (мал. 2.6). Спіральна побудова виявляє значну стабільність. Симетрію спіральних структур зручно описувати за допомогою двох параметрів: число одиниць на виток (u , це число необов'язково ціле) і відстанню між одиницями уздовж осі спіралі p . Крок спіралі P дорівнює pu ; $P=pu$.

У випадку спіральних капсидів, капсомерами є білкові субодиниці.

Спіральні структури мають поворотну вісь симетрії, яка співпадає з віссю спіралі.



Малюнок 2.6. Схематичне зображення фрагмента віріону вірусу тютюнової мозаїки. Капсид ВТМ розміром 18×300 нм є спіраллю, що складається з 130 витків з кроком спіралі 2,3 нм. На виток спіралі припадає 16 і $1/3$ субодиниць. Спіраль сформована з 2130 ідентичних молекул білку (капсомерів), що містять по 158 амінокислотних залишків.

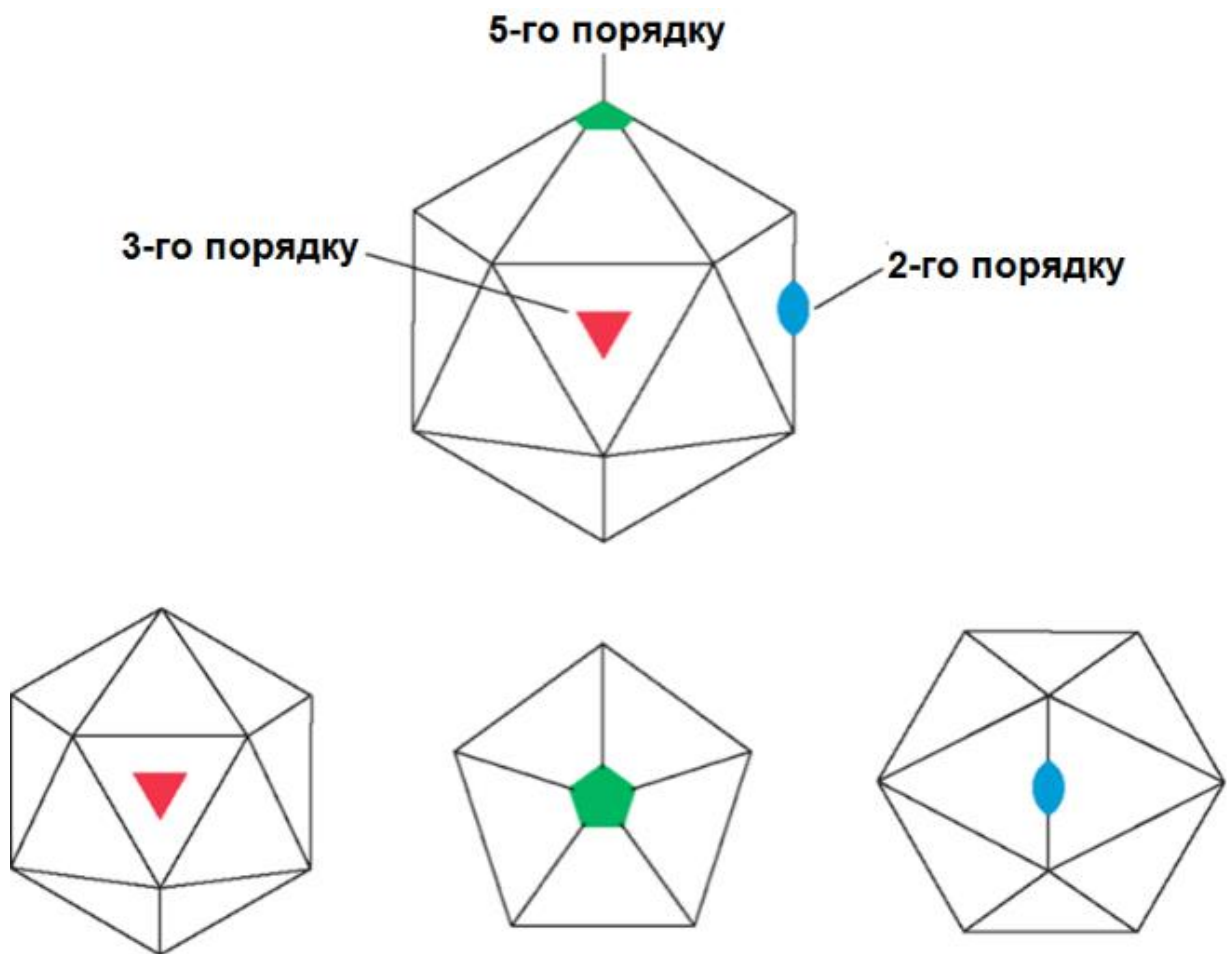
Симетрія ізометричних вірусних часток

Замкнені оболонки віріонів, які є замкнутим чохлам більш або менш округлої форми, побудованим з окремих субодиниць, які специфічно взаємодіють між собою, можуть мати тільки кубічну симетрію, тобто бути правильними опуклими багатогранниками: тетраедром, кубом (гексаедром), октаедром, додекаедром або ікосаедром.

З усіх можливих правильних опуклих багатогранників, для побудови віріону найбільш ефективним буде ікосаедр (точніше – багатогранник з ікосаедричною симетрією), оскільки у такому випадку при зборці капсиду фіксованого розміру будуть використані субодиниці мінімального розміру. Інакше кажучи, ікосаедр дозволяє побудувати віріон певного розміру з мінімальною витратою генетичного матеріалу на кодування білку, з якого будується капсид. Таким чином, з усіх опуклих багатогранників тільки ікосаедр використовується для побудови ізометричних віріонів.

Ікосаедр (мал. 2.7) має 20 ідентичних граней, кожна з яких є рівнобоким трикутником, 12 вершин, і має осі симетрії 5, 3 і 2 порядків. Порядок осі обертальної симетрії є числом, на яке слід розділити 360° , щоб визначити кут, при повороті на який тіло переходить саме в себе. Так, для осі симетрії 5-го порядку цей кут дорівнює 72° , 3-го порядку – 120° , 2-го порядку – 180° .

Дон Каспар і Аарон Клуг в 1962 році розробили теорію, виходячи з якої передбачили форми багатогранників, яким відповідають ізометричні віріони, і зіставили з ними електронно-мікроскопічні зображення різних типів капсидів.



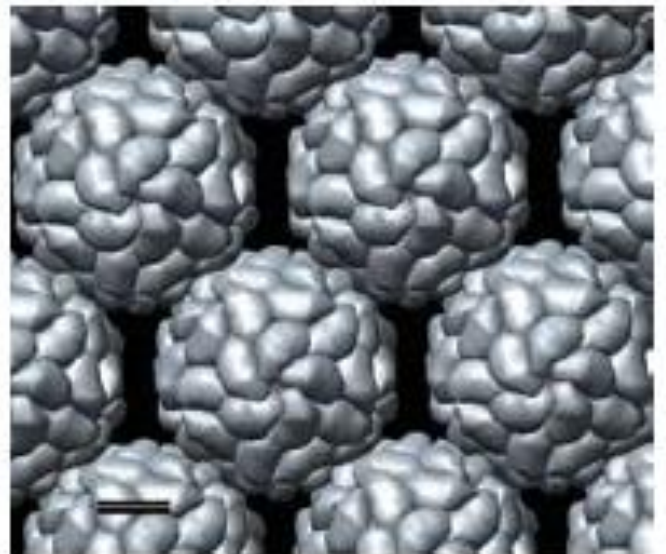
Малюнок 2.7. Ікосаедрична симетрія. Показано положення осей симетрії правильного ікосаедра і вид ікосаедра з боку осей симетрії.

Слід звернути увагу на важливу відмінність між поняттями симетрія і форма. Симетрія — це головна особливість об'єкту. Її можна визначити як набір усіх операцій (в даному випадку поворотів), які переводять об'єкт сам в себе. Форма — це усього лише загальний вигляд поверхні об'єкту. Багато об'єктів, що мають ікосаедричну симетрію, не мають форми ікосаедра (мал. 2.8). І багато віріонів вірусів, які підпорядковуються ікосаедричній симетрії, можуть не мати форми ікосаедра.



Малюнок 2.8. Приклад об'єкту, що має симетрію ікосаедра, але який не є ікосаедр.

Як спочатку підраховали Дж. Вотсон і Ф. Крик, правильний ікосаедр можна побудувати мінімально з 60 ідентичних субодиниць, які однаковим чином взаємодіють одна з одною. Іншими словами можна сказати, що між молекулами білку в капсиді є еквівалентні зв'язки. Капсиди цілої низки дрібних вірусів дійсно є ікосаедрами, побудованими з 60 молекул білку, між якими є еквівалентні зв'язки (мал. 2.8).

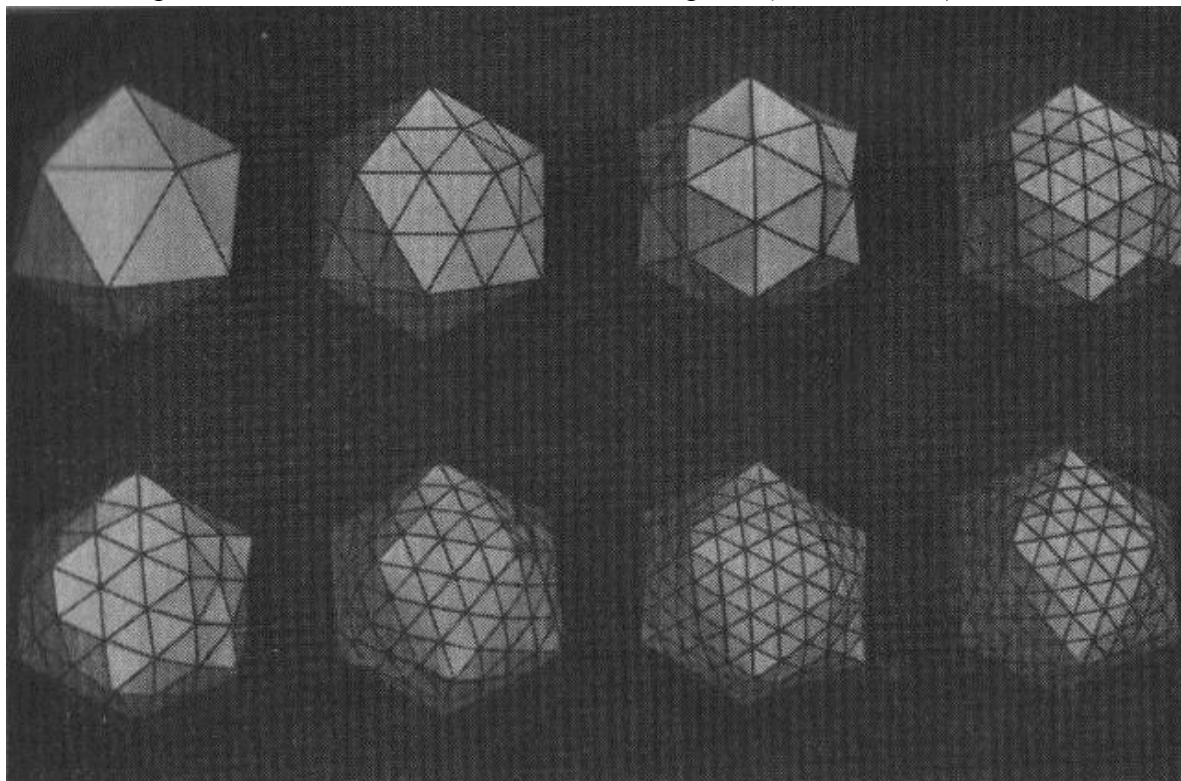


Малюнок 2.8. Ліворуч – схема розташування 60 молекул білку (показані червоним кольором), по три на кожен трикутну грань ікосаедра, з еквівалентними (однаковими) зв'язками для кожної молекули. Праворуч – реконструкція капсиду сателіта вірусу тютюнової мозаїки. Смушка дорівнює 5 нм. Зверніть увагу, що в кожній вершині ікосаедра разом сходяться п'ять молекул білку, утворюючи кластер (пентамер).

Проте у більшості вірусів молекула нуклеїнової кислоти занадто велика, щоб її можна було помістити в капсид з 60 білкових субодиниць. Яким чином цю проблему можна розв'язати? Збільшення розміру білкової субодиниці не призведе до успіху, оскільки при цьому збільшиться не стільки розмір капсиду, скільки товщина його стінок. Крім того, білок більшого розміру вимагатиме для свого кодування більшу ділянку вірусного генома.

Більш ефективним рішенням є збільшення кількості білкових субодиниць для побудови капсиду. Проте число субодиниць не може бути довільним. Симетричну структуру, що має

симетрію ікосаедра, з участю більш ніж 60 субодиниць можна побудувати тільки за певними правилами. Д. Каспар і А. Круг показали, що кожен трикутний грань ікосаедра можна умовно розділити на ряд рівнобоких трикутників меншого розміру, тобто провести триангуляцію. Якщо трикутні грані ікосаедра розділити на менші рівнобокі трикутники, то утворяться багатогранники, які мають ікосаедричну симетрію, проте можуть і не бути істинними ікосаедрами. Іноді їх називають ікосадельтаедрами (малюнок 2.9).



Малюнок 2.9. Приклади правильних багатогранників, що мають ікосаедричну симетрію (ікосадельтаедрів). Істинними ікосаедрами є тільки два крайніх ліворуч у верхньому ряду.

Число трикутників на кожен грань ікосаедра називають триангуляційним числом T . Чому воно може дорівнювати, тобто на скільки рівнобоких однакових трикутників можна розділити кожен трикутний поверхню ікосаедра? Відповідь на це питання дає стереометрія. Кількість цих трикутників обчислюється за наступною формулою:

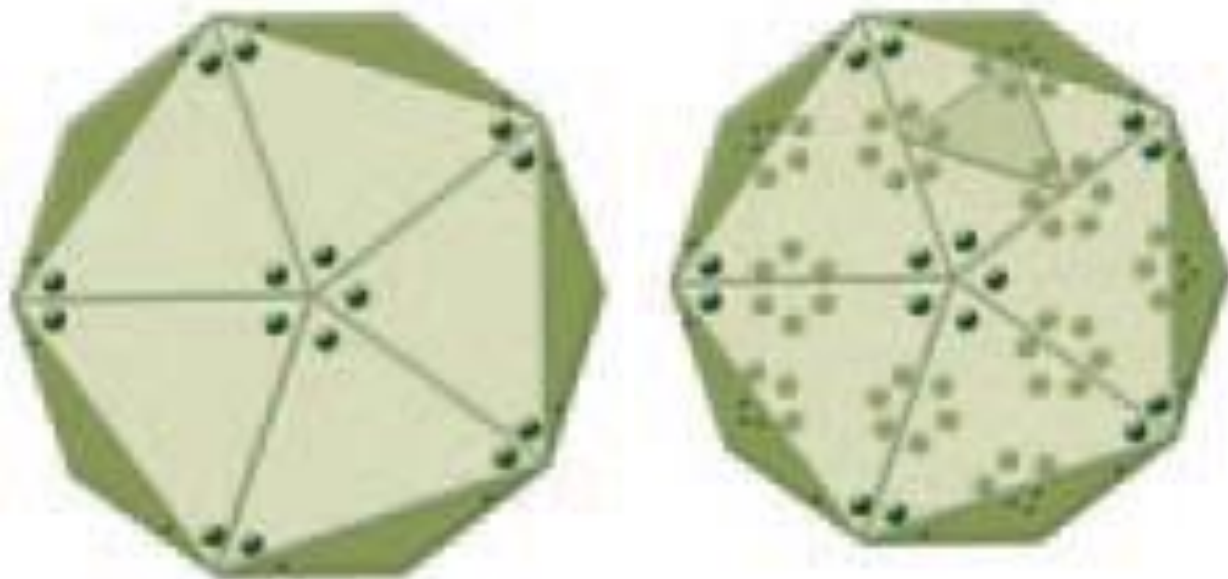
$$T = Pf^2$$

де T – триангуляційне число, P визначається виразом $h^2 + hk + k^2$. У цьому виразі h і k є натуральними числами, що не мають загального множника, $f = 1, 2, 3, 4$ і так далі.

В усіх досліджених на сьогодні вірусів, значення P дорівнюють 1 ($h = 1, k = 0$), 3 ($h = 1, k = 1$) і 7 ($h = 1, k = 2$). T може набувати значень 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 16, 19, 21, 25, 27, 28 і так далі. При $P = 1$ або 3, утворюються правильні ікосаедри. Загальна кількість субодиниць білку в капсиді дорівнює $60T$. У таблиці нижче наведені приклади параметрів віріонів деяких вірусів.

P	f	$T = Pf^2$	Кількість субодиниць ($60T$)	Приклад
1	1	1	60	Сателіт вірусу некрозу тютюну
3	1	3	180	Вірус кущистої карликовості томатів
1	2	4	240	Вірус Сіндбіс
1	4	16	960	Герпесвіруси
1	5	25	1500	Аденовіруси

При збільшенні числа субодиниць, з яких побудований віріон, виникають певні проблеми. Річ у тому, що при збільшенні числа структурних одиниць зв'язки між ними перестають бути еквівалентними. Наприклад, в простому випадку при $T=1$ віріон побудований з 60 субодиниць. Вони розташовані по кутах кожної трикутної грані. Усі субодиниці у вершинах ікосаедра групуються в пентамери, і кожна субодиниця має абсолютно однотипні, еквівалентні зв'язки з сусідніми субодиницями (мал. 2.8). Проте, наприклад, при $T=4$ віріон будується з 240 субодиниць, і деякі з цих субодиниць не торкаються вершин ікосаедра і групуються в гексамери. Таким чином, зв'язки між субодиницями, що знаходяться в різних частинах капсиду, в чомусь розрізнятимуться, не будуть повністю еквівалентними – в одному випадку разом взаємодіють п'ять структурних елементів, а в іншому шість (мал. 2.10).



Малюнок 2.10. Розташування $60T$ ідентичних субодиниць на поверхні ікосаедра. Ліворуч – $T=1$, 60 субодиниць розташовані у вершинах кожної трикутної грані. Усі субодиниці зв'язані еквівалентними зв'язками. У вершинах ікосаедра вони утворюють пентамери. Праворуч – $T=4$. Кожна трикутна грань розділена на 4 однакових рівнобоких трикутника. Субодиниці розташовані у вершинах цих трикутників. Всього є 240 субодиниць. Проте, оскільки темні субодиниці утворюють пентамери, а світлі субодиниці гексамери, то члени кожної групи формують квазіеквівалентні зв'язки.

У зв'язку з цим, виникає проблема – яким чином забезпечується альтернативність зв'язування субодиниць? Відповідь на це питання полягає в тому, що між субодиницями в складних віріонах формуються **квазіеквівалентні зв'язки**, що відмітили Д. Каспар і А. Круг. Нековалентні зв'язки, що формуються між білковими субодиницями, мають певну лабільність, можливо пов'язану з деякими змінами конформації білку. Завдяки цьому субодиниці як би «підлаштовуються» під конкретне положення в капсиді, і зрештою все одно формують структуру з мінімумом вільної енергії.

Підхід Д. Каспара і А. Круга виявився дуже плідним, і квазіеквівалентність взаємодій субодиниць в капсидах вірусів нині доведена за допомогою рентгеноструктурного аналізу. На основі структурних даних стала зрозуміла і природа квазіеквівалентності. Як правило, у білках є невеликий сегмент поліпептидного ланцюга (10–30 амінокислотних залишків), який впорядкований на одних і розупорядкований на схожих (квазіеквівалентних) поверхнях, що сприяє утворенню як гексамерів, так і пентамерів, які і формують ікосаедрічний капсид. Конформація білку залежить від умов зборки капсиду, і таких чинників, як іони металів, рН, та інших, які змінюють характер взаємодій білку і, в підсумку, на основі квазіеквівалентних взаємодій формуються капсид, побудований з $60T$ субодиниць.

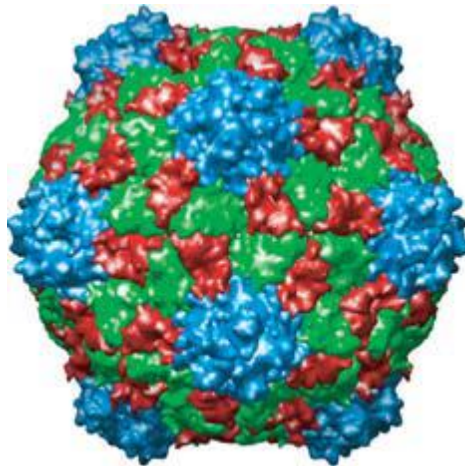
На електронних мікрофотографіях віріонів часто спостерігаються групи з п'яти або шести виступів. Це явище назвали пентамерно-гексамерною кластеризацією, а відповідні морфологічні одиниці називають пентонами і гексонами. У випадку такої агрегації білків оболонки віріону пентони і гексони є капсомерами. Ймовірно, угруповання субодиниць в капсомери сприяє збільшенню до максимуму числа контактів між субодиницями, що повинно виключати утворення між ними щілин.

У ікосадельтаедрів, що не є істинними ікосаедрами, залишається 12 вершин, де субодиниці зібрані в пентамери. У більшості випадків число капсомерів, з яких складаються такі віріони, легко обчислити: воно дорівнює $10(T-1)$ гексонів і 12 пентонів.

Таким чином, морфологічні одиниці, видимі в електронному мікроскопі, зазвичай називають капсомерами, і їх число не обов'язково дорівнює числу білкових субодиниць, з яких складається віріон. В деяких випадках, наприклад у вірусу тютюнової мозаїки, капсомером є окрема білкова субодиниця. У інших випадках капсомери можуть складатися з комплексу декількох білків, наприклад шести білків в гексоні. У деяких вірусів капсомери можуть складатися з іншої кількості білків. Строго кажучи, морфологічна одиниця є капсомером, якщо білки, з яких вона складається, утворюють більш менш міцний агрегат і залишаються разом в умовах м'якої дезінтеграції.

Зборка капсиду з ідентичних субодиниць білку — простий і економічний спосіб для упаковки і зберігання вірусного генома. Низка вірусів, особливо вірусів рослин, має структуру капсиду з $T=3$, тобто їх капсид побудований з 180 однакових білкових субодиниць.

Проте капсиди багатьох ікосаедричних вірусів складаються більш ніж з одного типу білку. Наприклад, капсид вірусу мозаїки вігни складається з білків двох типів: молекули білку одного типу є присутніми у вигляді пентамерів у вершинах ікосаедра, а білок іншого типу формує «гексамери» на гранях, причому кожен «гексамер» складається з трьох копій молекул цього білку; при цьому кожна молекула складається з двох доменів (мал. 2.11).

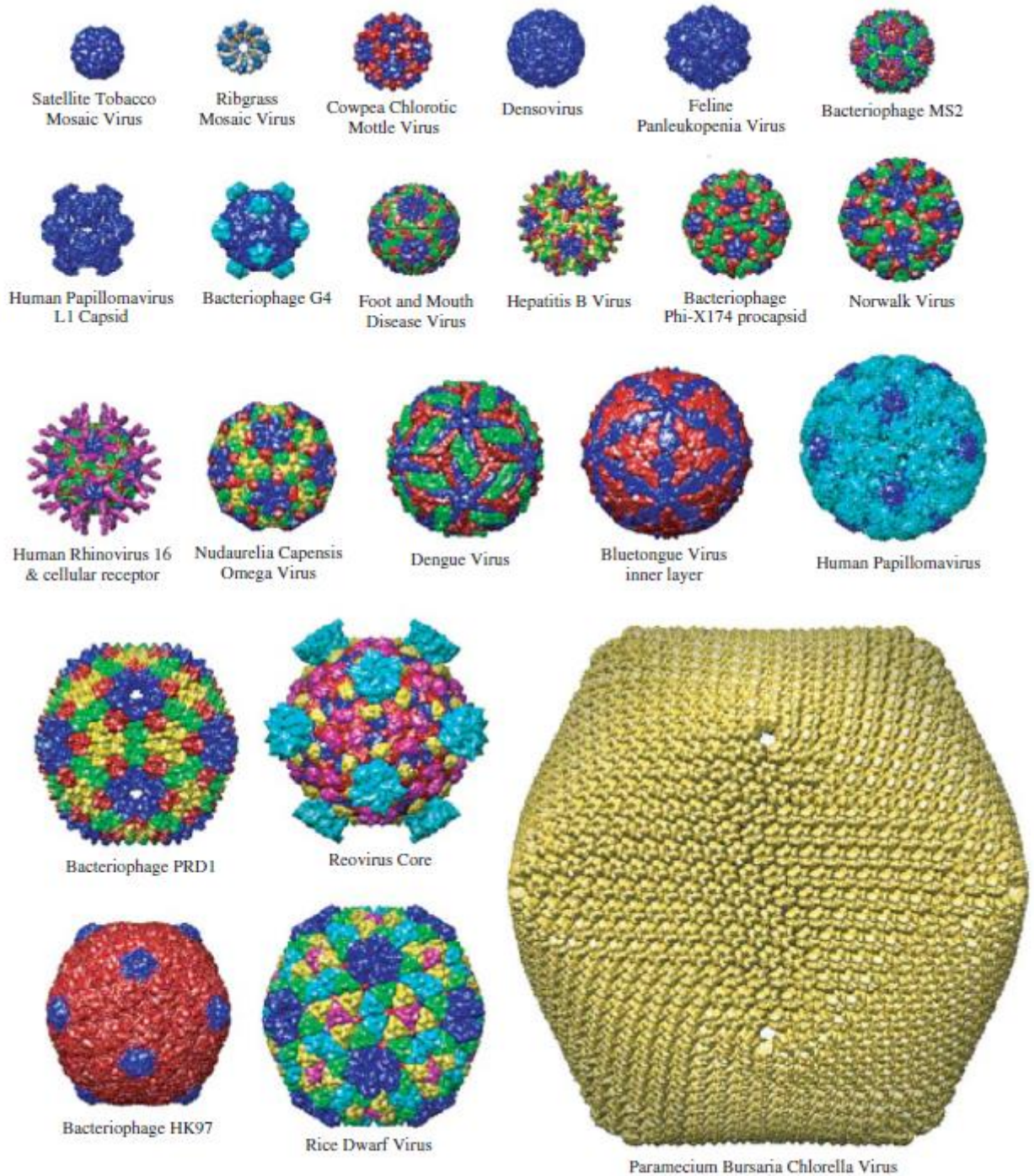


Малюнок 2.11. Реконструкція капсиду вірусу мозаїки вігни, що складається з двох типів молекул білку. Білок одного типу (показаний блакитним кольором) формує 12 пентамерів на вершинах ікосаедра, тоді як молекули іншого білку, що складаються з двох доменів (показані зеленим і червоним) формують 20 «гексамерів» на гранях; при цьому кожен «гексамер» формується з трьох молекул білку.

Віруси, що мають ікосаедричні капсиди, виявляють значну різноманітність розмірів і морфології капсидів. Приклади реконструкцій капсидів різних вірусів, виконані на підставі електронних мікрофотографій і рентгеноструктурного аналізу, наведені на мал. 2.12. Незважаючи на усю різноманітність, кожен капсид є структурою, що має мінімум вільної енергії для конкретного типу білку або білків, які формують цей капсид.

Поверхня капсидів має дуже різноманітну топографію. На ній можуть бути присутніми

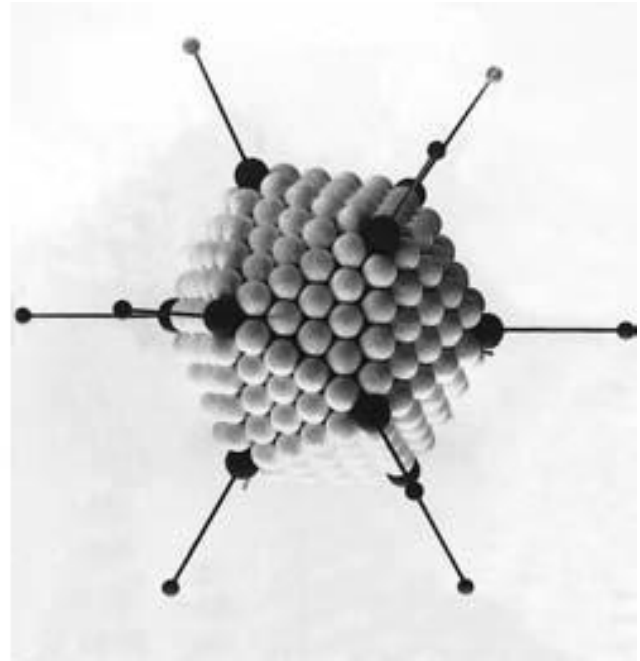
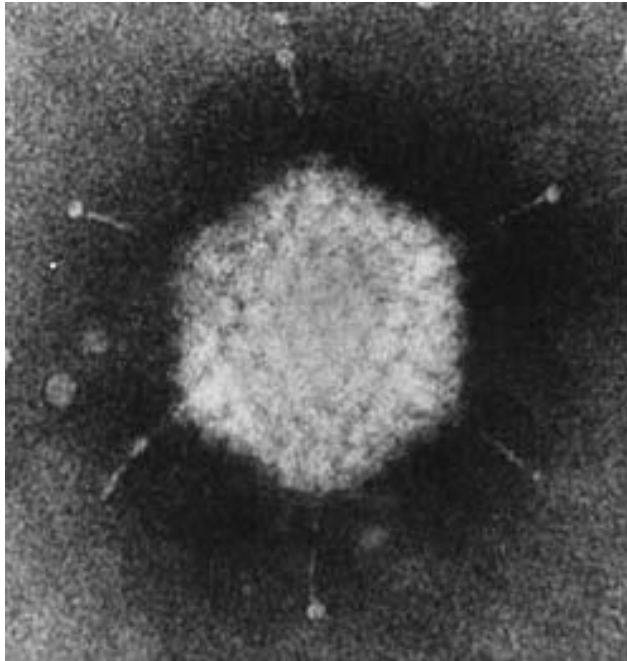
утворювані білками западини, гребні, виступи і інші елементи.



Малюнок 2.12. Капсиди з ікосаедричною симетрією, що виявляють значне варіювання в розмірах і архітектурі. Смужка дорівнює 50 нм.

Деякі віруси з ікосаедричними капсидами мають особливі структури в кожній з 12 вершин. Наприклад, віріони аденовірусів тварин мають структуру з $T=25$. Їх капсид складається з 240 гексамерів (гексонів) і 12 пентамерів (пентонів), а також виростів (фібрил), що виступають з кожної вершини віріону (мал. 2.13). Капсид має сувору ікосаедричну симетрію. Фібрили, пентони і гексони складаються з різних білків. Тут виникає проблема вибудовування трьох різних білків правильним способом з урахуванням принципів, відмічених вище. Ця проблема вирішується організацією фібрил і пентамерів у вершинах ікосаедра, а гексамерів на його гранях. Проте якщо пентамери складаються з п'яти пептидних ланцюгів,

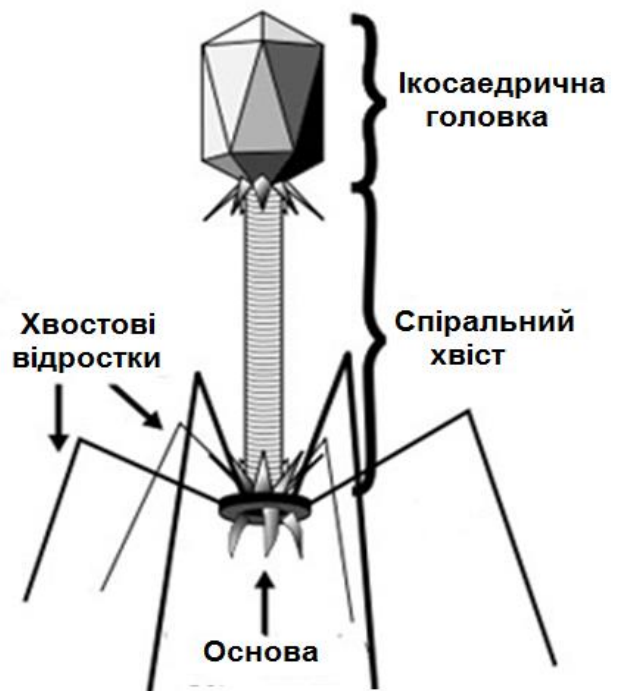
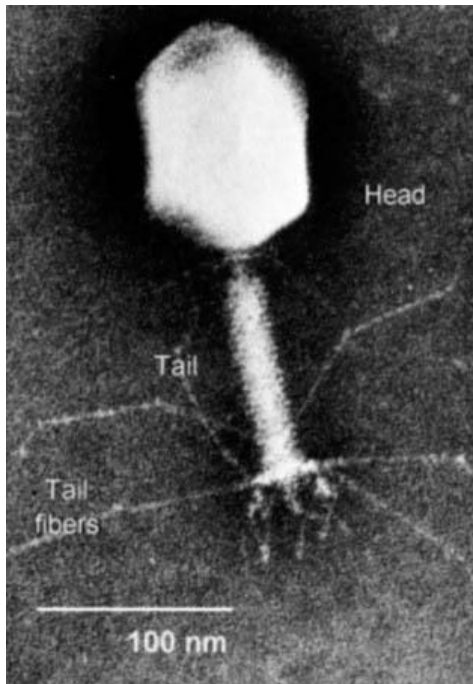
то кожен гексамер фактично складається з трьох ідентичних поліпептидів. Проте кожен з цих поліпептидів функціонує як **дві** субодиниці, тому капсид аденовірусів складається з 1500 субодиниць (1440 субодиниць в гексонах і 60 субодиниць в пентонах), хоча фактичне число окремих поліпептидів є меншим.



Малюнок 2.13. Структура капсиду аденовірусів ($T=25$, 1500 субодиниць). Ліворуч електронна мікрофотографія віріону, праворуч модель капсиду, на якій показані групування капсомерів (240 гексамерів і 12 пентамерів) і фібрили на вершинах капсиду.

Віріони, що мають морфологію голівка-хвіст

Багато вірусів бактерій (бактеріофаги) мають капсиди з ікосаедричною симетрією. Проте унікальною для низки бактеріофагів є морфологія голівка-хвіст (малюнок 2.14).



Малюнок 2.14. Віріони, що мають морфологію голівка-хвіст. Ліворуч - електронна мікрофотографія бактеріофага, праворуч – схема будови віріону бактеріофага.

В межах цієї морфології є значні варіації, і бактеріофаги можуть бути розділені на ті, що мають короткий хвіст, довгий хвіст, що не скорочується, і складний хвіст, що скорочується.

У віріону може бути присутнім ряд інших структурних елементів, таких як базальна пластинка, комірць і т. д. Незважаючи на складну структуру, принципи дизайну віріонів фагів з організацією голівка-хвіст подібні розглянутим вище. Голівки зазвичай мають ікосаедричну симетрію, тоді як хвости зазвичай мають спіральну симетрію. Інші структури, типу комірців і базальних пластинок, також мають певний тип симетрії. Походження структури голівка-хвіст в еволюційному аспекті може бути пов'язано зі способом, яким бактерійні віруси заражають сприйнятливі клітини.

Деякі віруси мають віріони, які не відповідають розглянутим структурам, і правила, які направляють їх формування, поки залишаються незрозумілими. Наприклад, поксвіруси, до яких належить вірус віспи, мають складну структуру оболонки, що покриває два бічні тіла і двовігнуте ядро, яке містить ферменти вірусу. Нарешті, нещодавно відкриті найбільші віруси, мімівіруси і мегавіруси, мають сферичні частки, покриті ікосаедричними капсидами, які у свою чергу покриті волокниною. Морфогенез віріонів цих вірусів доки знаходиться поза сучасним розумінням.

2.1.3. Ліпідні мембрани у віріонах

Багато вірусів у своїх віріонах мають компоненти, представлені ліпідними мембранами. У більшості випадків ці мембрани знаходяться на поверхні віріонів, асоційовані з одним (або більше) типом вірусних білків і є оболонкою віріонів, що оточує нуклеокапсид. Деякі віруси, проте, мають мембрани, розташовані не на поверхні, а усередині капсиду. За своїм походженням, мембрани у віріонах найчастіше є мембранами клітини хазяїна.

Оболонка віріонів

Значна кількість вірусів тварин і деякі віруси рослин оточені оболонкою. До числа таких вірусів належать усі віруси тварин, капсид яких має спіральну симетрію, наприклад віріони вірусу грипу, і багато вірусів, що мають ікосаедричну симетрію. Оточені оболонкою віруси значно рідше зустрічаються серед вірусів рослин, і у край рідко серед вірусів, які вражають прокаріот.

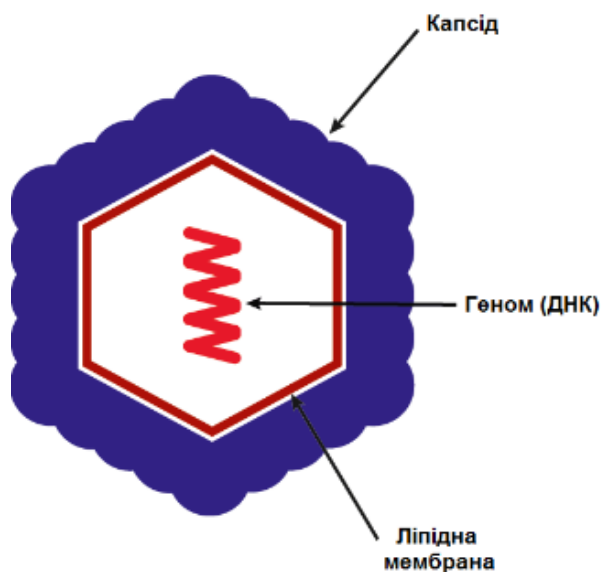
Оболонка віріону має походження від мембрани клітини хазяїна, і він її отримує за допомогою брунькування через мембрану хазяїна. Такими мембранами можуть бути плазмалема, мембрани ендоплазматичного ретикулуму, апарату Гольджі або оболонки ядра. Перед включенням у віріон, мембрана хазяїна зазнає певну модифікацію. Наприклад, оболонка віріону вірусу імунодефіциту людини 1, яка має походження від плазматичної мембрани клітини хазяїна, після включення у віріон містить більше холестерину і сфінгомеліну і менше фосфатидилхоліну і фосфатидилінозиту, ніж вихідна мембрана хазяїна.

Деякі віруси здатні реплікуватися у більш ніж одному типі клітин хазяїна, і склад ліпідів оболонки залежить від типу клітин, з яких сталося вивільнення вірусу. Наприклад, альфавіруси реплікуються як в клітинах ссавців, так і в клітинах комах. І коли вірус лісу Семлікі (збудник однойменної лихоманки) реплікується в клітинах нирки хом'яка, оболонка дочірніх віріонів містить приблизно в п'ять разів більше холестерину при порівнянні з тим же вірусом, який реплікується в клітинах комарів.

З мембраною оболонки вірусів асоційовані один або більше типів вірусних білків. Ці білки найчастіше є інтегральними білками і часто присутні у вигляді мультимерів. Ці білки кодуються вірусними геномами. Білки клітини хазяїна до складу оболонки віріону зазвичай не входять. Як клітинні білки виключаються з оболонки і чому в цьому відношенні виключенням є ретровіруси, у яких деякі білки хазяїна зостаються, залишається неясним.

Віріони з внутрішніми мембранами

Є декілька видів вірусів (наприклад, іридовіруси), у яких ліпідна мембрана знаходиться усередині капсиду (мал. 2.15). При цьому деякі іридовіруси мають також зовнішню ліпідну оболонку.



Малюнок 2.15. Схема будови віріону іридовірусу. Ліпідна мембрана розташована усередині капсиду.

Розглянуті морфологічні структури віріонів не трапляються з приблизно однаковою частотою серед вірусів, що заражають тварин, рослини і бактерії, як показано в таблиці нижче. Рационального пояснення подібного розподілу фактично немає.

Частота трапляння різних типів віріонів серед вірусів тварин, рослин і бактерій

Структура віріону	Віруси тварин	Віруси рослин	Бактеріофаги
Ікосаедричний капсид без оболонки	Звичайний	Звичайний	Зустрічається нечасто
Спіральний капсид без оболонки	Не відомий	Звичайний	Зустрічається рідко
Ікосаедричний капсид з оболонкою	Зустрічається нечасто	Невідомий	Зустрічається у край рідко
Спіральний капсид з оболонкою	Звичайний	Зустрічається нечасто	Зустрічається у край рідко
Голівка-хвіст	Не відомий	Не відомий	Звичайний

2.2. Хімічний склад віріонів

Основними хімічними сполуками, які входять до складу віріонів усіх вірусів, є білки і нуклеїнові кислоти. До складу низки вірусів входять ще ліпіди і вуглеводи, а також деякі інші компоненти.

2.2.1. Нуклеїнові кислоти

Клітини усіх живих організмів містять два види нуклеїнової кислоти — ДНК (дволанцюгова ДНК клітинного генома) і РНК (мРНК, тРНК, рРНК і деякі інші лабільні форми РНК). На відміну від клітин, віріони містять тільки один вид нуклеїнової кислоти — ДНК або РНК. І та і інша зберігають спадкову інформацію і виконують функції генома. Зберігання генетичної інформації у вигляді РНК — унікальна властивість вірусів. Слід враховувати, що наявність одного виду нуклеїнової кислоти є характеристикою віріону, але не вірусу. У

циклі реплікації вірусу його геномна нуклеїнова кислота транскрибується, тобто віруси, що містять ДНК, утворюють РНК. У свою чергу низка вірусів, які містять РНК, мають в циклі репродукції стадію зворотної транскрипції і синтезують ДНК на матриці РНК. Приблизно 20% усіх вірусів мають ДНК-геном, 80% — РНК-геном.

Кожна молекула нуклеїнової кислоти вірусного генома є або одноланцюговою (ол), або дволанцюговою (дл); таким чином, вірусні геноми мають чотири типи: длДНК, олДНК, длРНК і олРНК. І якщо длДНК вірусів являє собою такий же тип спадкового матеріалу, як і в усіх живих організмів, то інші три типи генома є унікальними для вірусів. Цікаво відмітити, що більшість вірусів грибів мають в геномі длРНК, у більшості вірусів рослин геном представлений олРНК, а більшість бактеріофагів мають геноми у вигляді длДНК. Причина такого розподілу, можливо, пов'язана з різним походженням вірусів у цих хазяїв, що дуже розрізняються.

Подальшу класифікацію нуклеїнових кислот вірусів можна виконати на підставі того, чи є їх молекули лінійними, з вільними 5'- і 3'-кінцями, або кільцевими в результаті ковалентного зв'язування кінців. Слід зазначити, що деякі лінійні молекули вірусних нуклеїнових кислот можуть мати кільцеву форму не за рахунок ковалентного зв'язування, а за рахунок спаровування комплементарних основ на їх кінцях.

Розмір геномів вірусів варіює в надзвичайно широких межах. Цирковіруси свиней (олДНК) і вірус гепатиту дельта (олРНК) мають геноми розміром близько 1,7 тисяч нуклеотидів. З іншого боку, максимальний розмір вірусних геномів залежить від типу нуклеїнової кислоти. Найбільш великі РНК-геноми виявлені у коронавірусів і складають близько 33 тисяч нуклеотидів олРНК. Усі найбільші вірусні геноми представлені длДНК і досягають більше 1,2 млн. пар нуклеотидів у мімівірусів і мегавірусів.

Більшість вірусних геномів складаються з єдиної молекули нуклеїнової кислоти, але у деяких вірусів геноми складаються з двох або більше сегментів. Такі сегментовані геноми частіше зустрічаються у РНК-вмісних вірусів у порівнянні з ДНК-вмісними. Більшість вірусів, що містять длРНК, мають сегментовані геноми.

Геноми вірусів кодують вірусні білки, а також містять додаткову інформацію, таку як сигнали для контролю експресії генів. Частина такої інформації міститься в нуклеотидних послідовностях, проте геноми, представлені одноланцюговими нуклеїновими кислотами, можуть містити сигнали у вигляді вторинних і третинних структур, які формуються за рахунок спаровування комплементарних основ усередині молекули нуклеїнової кислоти.

За рахунок внутрішньомолекулярного спаровування формуються регіони нуклеїнової кислоти, що мають вторинні структури типу стебло-петля або псевдовузли. Регіони одноланцюгових нуклеїнових кислот з вторинними структурами також можуть згортатися в третинні структури, що мають специфічні форми, які важливі для реплікації вірусів.

Окрім утворення вторинних і третинних структур, для реплікації вірусів є важливими деякі модифікації кінців їх геномів. Так, деякі віруси містять нуклеїнові кислоти, які на 5'-кінці ковалентно пов'язані з молекулою білку. Деякі РНК-геноми мають модифікації, які характерні для матричних РНК клітини – структуру кепа на 5'-кінці і поліаденіловий (поліА) хвіст на 3'-кінці. Геноми багатьох РНК-вмісних вірусів можуть функціонувати як мРНК, і структури кепа і поліА можуть вказувати, що молекула готова функціонувати як мРНК, хоча жодна з цих двох структур не є абсолютно необхідною для трансляції.

Усі ці особливості геномів вірусів детальніше розглядатимуться у відповідних розділах.

Пакування генома у віріон: взаємодія білків з нуклеїновою кислотою

Нуклеїнові кислоти і асоційовані з ними білки формують в капсиді суперспірально складні структури.

Цілком зрозуміло, що білки капсиду повинні так чи інакше взаємодіяти з нуклеїновою кислотою генома. Ця взаємодія очевидна для вірусів зі спіральною симетрією, у яких кожна субодиниця білку однаковим чином взаємодіє з ланцюгом нуклеїнової кислоти, укладеної спірально.

Проте у віріонів з ікосаедричною симетрією усе складніше. Проблемою є фізична упаковка відносно великої молекули нуклеїнової кислоти у відносно маленький капсид. Просте згортання генома для пакування в такий обмежений простір є в деякому роді дивом топології саме по собі, але проблема посилюється фактом, що взаємне відштовхування сукупних негативних електростатичних зарядів фосфатних груп нуклеотидного остову означає, що геном чинить опір спробі втиснути його в обмежений простір. Віруси долають це утруднення шляхом пакування разом з геномом низки позитивно заряджених молекул, нейтралізуючих відштовхування негативних зарядів. До числа цих молекул входять позитивно заряджені іони (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ та ін.) і поліаміни. Крім того, нуклеїнові кислоти вірусів можуть бути нековалентно пов'язані з білками, збагаченими амінокислотними залишками з основними бічними ланцюгами, такими як аргінін, гістидин і лізин, які взаємодіють з геномом. Багато вірусів з дволанцюговою ДНК мають основні подібні гістонам білки, тісно пов'язані з ДНК. Деякі з цих білків кодуються самими вірусами. В інших випадках віруси використовують білки хазяїна, наприклад геном вірусу полііоми приймає подібну хроматину структуру завдяки асоціації з чотирма гістонами клітини (H2A, H2B, H3 і H4), аналогічно до того, як організований геном хазяїна.

2.2.2. Білки

Найпомітніші білки, які входять до складу віріонів, – це білки, що становлять вірусний капсид. Проте, окрім білків капсиду, віріони можуть містити і інші білки.

Віріон вірусу тютюнової мозаїки, геном якого невеликий, містить тільки один вид молекул білку, що формує його спіральний капсид. Віріони парвовірусів, також вірусів з невеликим геномом, містять від двох до чотирьох різних видів молекул білку. У міру збільшення розмірів генома, кількість видів молекул білку у віріоні зростає, і наприклад віріон вірусу простого герпесу 1 містить 39 видів молекул білку, а віріон вірусу водоростей *Paramecium bursaria Chlorella virus* 1 містить більше 100 видів молекул білку.

Білки, що є компонентами віріонів, виконують цілий ряд функцій. Найбільш очевидна функція – побудова капсиду для захисту вірусного генома. Крім того, у багатьох вірусів білки забезпечують прикріплення віріону до клітини хазяїна, злиття оболонки віріонів (для покритих оболонкою вірусів) з плазматичною мембраною і так далі.

Білки вірусів виконують і багато інших функцій в циклі реплікації вірусів. Наприклад, вони можуть бути ферментами (протеазами, зворотними транскриптазами та ін.), факторами транскрипції, праймерами для реплікації нуклеїнової кислоти, засобами пригнічення імунної відповіді хазяїна і тому подібне.

Білки, що кодуються геномом вірусу, розділяють на дві групи: структурні білки і неструктурні білки.

Структурні білки (VP, Virion Proteins) – білки, які входять до складу зрілого віріону, незалежно від того, чи беруть участь вони в побудові капсиду чи ні. До них належать білки капсиду, ферменти, упаковані в капсиді, компоненти ліпідної мембрани, білки матриксу, геномні білки, пов'язані з нуклеїновою кислотою і інші.

Неструктурні білки (NS, Non-Structural) – білки, які кодуються геномом вірусу і синтезуються в зараженій клітині, але не пакуються в зрілу вірусну частку. Це попередники структурних білків, регуляторні білки і ферменти, які обслуговують процес внутрішньоклітинної репродукції вірусу тощо. Вони не входять до складу вірусної частки.

2.2.3. Інші компоненти віріонів

Вірусні РНК в ДНК-геномних вірусах

Вірусні РНК є присутніми у низці віріонів ДНК-геномних вірусів. Гепаднавіруси і каулімовіруси містять короткі послідовності РНК, ковалентно прикріплені до їх ДНК. Ці РНК функціонують як праймери при синтезі ДНК і залишаються прикріпленими до геномів в зрілих віріонах.

Є також докази, що вірусні мРНК пакуються в геноми герпесвірусів, але роль цих молекул залишається невідомою.

Молекули клітини-хазяїна

Раніше було згадано, що віріони деяких вірусів містять ліпідні мембрани, які мають клітинне походження. До інших молекул клітини, які включаються до складу віріонів, відносяться наступні.

- **Транспортні РНК.** Молекули тРНК хазяїна включаються у віріони ретровірусів.
- **Білки.** При зборці віріонів деякі білки хазяїна можуть включатися до його складу. Наприклад, у віріони вірусу імунodefіциту людини 1 включається низка клітинних білків, до числа яких входять циклофілін А, асоційований з капсидом, і антигени лейкоцитів людини, що входять до складу оболонки віріону.
- **Поліаміни і катіони.** У віріони ряду вірусів входять спермідін і інші поліаміни, а також катіони, такі як Na^+ , K^+ , Zn^{2+} і Mg^{2+} . Єдиною вірогідною функцією поліамінів і катіонів є нейтралізація негативного заряду вірусного генома при пакуванні нуклеїнової кислоти в капсид.

Окрім вказаних молекул, віріони також містять вуглеводи, які входять до складу глікопротеїнів. Кількість цукрів у складі глікопротеїнів може бути досить великою, досягаючи 10-13% від маси віріону. Хімічна специфічність їх повністю визначається клітинними ферментами, що забезпечують перенесення і приєднання відповідних цукрових залишків. Звичайними цукровими залишками, що виявляються у вірусних білках, є фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, нейрамінова кислота, ацетилглюкозамін. Таким чином, подібно до ліпідів, вуглеводний компонент визначається клітиною-хазяїном, завдяки чому один і той же вірус, що реплікується в клітинах різних видів хазяїв, може значно розрізнятися по складу вуглеводів залежно від специфічності клітинних глікозилтрансфераз.

Після вивчення цієї глави ви повинні:

- Охарактеризувати компоненти віріона
- Знати принципи структурної організації віріонів
- Пояснити, чому віріони мають симетричну побудову
- Знати різноманіття вірусних геномів
- Охарактеризувати функції структурних і не структурних білків вірусів

Додаткове читання до глави 2.

1. Костюченко В.А., Месянжинов В.В. Архитектура сферических вирусов // Успехи биологической химии, 2002, т. 42, с. 177—192.
2. Amos L.A., Finch J.T. Aaron Klug and the revolution in biomolecular structure determination

// Trends Cell Biol.- 2004.-V. 14,№3.- P. 148-152.

3. Caspar D.L., Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. - 1962.- V.27.- P.1-24.
4. Chiu W., Rixon F.J. High resolution structural studies of complex icosahedral viruses: a brief overview // Virus Res.- 2002.- V.82,№ 1-2.-P.9-17.
5. 3. Crick F.H.C., Watson J. D. Virus structure: general principles // Ciba Foundation symposium on the nature of viruses.- London: J.&A. Churchill, 1957.- P. 5--13.
6. Johnson J.E., Chiu W. Structures of virus and virus - like particles // Curr. Opin. Struct. Biol. - 2000.-V.10,№ 2.-P.229--235.
7. Lee K.K., Johnson J.E. Complementary approaches to structure determination of icosahedral viruses // Curr. Opin. Struct. Biol.- 2003.-V.13,№5.-P.558-569.
8. Nadège Ph., Matthieu L., Gabriel D. et al. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes // Science.—2013.— 341 (6143): 281–286.
9. Sharma V., Colson P., Chabrol O., Pontarotti P., Raoult D. *Pithovirus sibericum*, a new bona fide member of the "Fourth TRUC" club. // Frontiers in microbiology. — 2015. — Vol. 6. — P. 722.

Глава 3. Класифікація вірусів

1. Класифікація на основі типу захворювання
2. Класифікація на основі виду хазяїна
3. Класифікація Д. Балтимора
4. Сучасна класифікація і номенклатура вірусів

Число відомих сьогодні вірусів перевищує 7000. Вочевидь, є необхідність якось упорядкувати усе це різноманіття, виділити загальні властивості та відмінності близьких груп вірусів, які б дозволили детально вивчати характерних представників кожної групи, а не кожен вірус окремо.

Після відкриття вірусів, була відома єдина їх фізико-хімічна особливість – здатність проходити через бактерійні фільтри. По суті, це була оцінка розміру віріонів вірусів, яка ставила їх окремо від мікроорганізмів. У той час визначення інших властивостей вірусів було неможливим, тому дослідження були спрямовані на вивчення інфекційного процесу і реакції на зараження з боку організму. З цієї причини перші спроби класифікації ґрунтувалися на схожості патогенних властивостей вірусу, наприклад, виділяли «віруси гепатиту», або на їх органотропності, наприклад «респіраторні віруси». У міру проникнення в природу вірусів, з 1950-х років робилися різноманітні спроби їх класифікації, на основі різноманітних властивостей. Були запропоновані ціла низка класифікацій, часто взаємовиключних.

3.1. Класифікація на основі типу захворювання

Першою і найбільш загальною рисою вірусів є та, що вони є інфекційними агентами, і можливо згрупувати віруси відповідно до природи хвороби, з якою вони асоційовані. Так, можна розглядати віруси, що викликають гепатит, або віруси, що викликають застуду. Такий підхід притягає своєю простотою. Проте цей метод групування вірусів, хоча і відбиває важливі характеристики, має великі недоліки. Він є антропоморфним, приділяючи увагу хворобі, яку ми розпізнаємо, оскільки вона впливає на людей або наших домашніх тварин. Проте при цьому ігнорується факт, що більшість вірусів або не викликають захворювань, або викликають захворювання, які нам невідомі, оскільки у нас немає повного розуміння хазяїв; наприклад, ми мало що знаємо про вірусні хвороби риб або амфібій. Також є можливим, що єдиний вірус викликає більш ніж одне захворювання; хорошим прикладом може слугувати вірус вітряної віспи, який викликає вітрянку при першому зараженні, проте при реактивації в подальшому викликає оперізуючий лишай (оперізуючий герпес). Ця проблема посилюється, якщо розглядати віруси, які заражають більше одного хазяїна. У такому випадку часто спостерігається, що вірус практично не викликає хвороби у одного хазяїна, але дуже сильно вражає іншого, або викликає різні захворювання у різних хазяїв. Класифікація, заснована на захворюванні, хоча і може бути корисна в деяких ситуаціях, не може передбачити загальні фундаментальні особливості вірусу. Наприклад у випадку гепатитів і застуди, їх викликають багато вірусів, що мають найрізноманітнішу молекулярну будову, і вивчення одного вірусу практично нічого не може повідомити нам про інших.

3.2. Класифікація на основі виду хазяїна

Альтернативним підходом є групування вірусів відповідно до видів хазяїв, яких вони інфікують. Такий підхід є привабливим, оскільки підкреслює паразитичну природу взаємодії вірус-хазяїн. Проте при практичному застосуванні він викликає утруднення. Деякі віруси мають дуже обмежений круг хазяїв і вражають тільки один вид живих організмів, наприклад вірус гепатиту В заражає тільки людей. Інші віруси мають вузький круг хазяїв,

наприклад поліовіруси вражають декілька видів приматів. Проте віруси можуть вражати абсолютно різних хазяїв. Наприклад, багато вірусів рослин можуть реплікуватися і в комахах-переносниках, і в рослинах-хазяях. З цієї причини класифікація вірусів на основі видів хазяїв, що вражаються, часто призводить до неоднозначності. Крім того, навіть якщо віруси вражають єдиний вид, це не означає, що вони подібні один до одного в сенсі захворювань, що викликають, або генетичної структури. З цієї причини, детальне вивчення одного вірусу, який вражає окремий вид живого організму або навіть тільки клітини конкретного типу в організмі, нічого не скаже про фундаментальні властивості інших вірусів, які вражають цей же вид і клітини цього ж типу.

3.3. Класифікація на основі морфології вірусних часток

Коли вірусні частки було розглянуто в електронному мікроскопі, класифікація груп вірусів на підставі спостережуваної форми або морфології віріону виявилася відносно простою. Ключовою структурною особливістю є наявність або відсутність ліпідної оболонки у вірусної частки.

Якщо віріон не має оболонки, то можливі три морфологічні категорії: чи є він ізометричним, нитчастим або комплексним. Ізометричні віруси, які мають округлу форму, підрозділяються на істинно ікосаедричні та ікосадельтаедри, які мають симетрію ікосаедра. Нитчасті віруси мають просту спіральну морфологію. Комплексна структура вірусної частки може бути представлена комбінацією ізометричного і нитчастого компонента, як наприклад у деяких бактеріофагів, або не мати відповідності простим геометричним правилам і бути неправильною за формою.

У віріонів з оболонкою подальші рівні класифікації можливі при описі нуклеокапсиду, що знаходиться усередині оболонки: він може бути ізометричним або спіральним.

Хоча класифікація на основі морфології проста і враховує особливості вірусів (а саме структуру віріонів), що не міняються, вона не є досить повною і вичерпною. Передусім, морфологія вірусної частки нічого не може повідомити нам стосовно молекулярній біології вірусних часток, що мають подібну форму, а також стосовно патології захворювань, що викликаються ними. Дві вірусні частки однакової морфології можуть мати інші фундаментальні характеристики такі, що кардинально розрізняються.

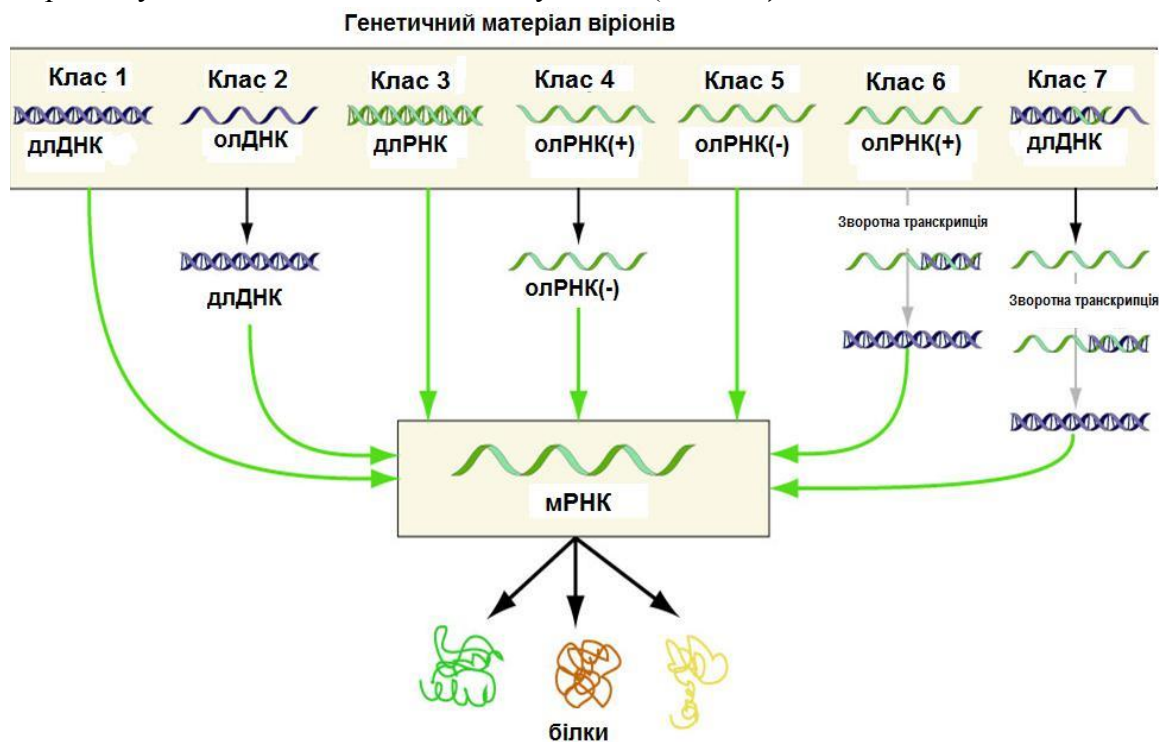
Незважаючи на зазначене, первинний опис вірусу по морфології його віріону є важливим загальним прийнятим підходом.

3.4. Класифікація Девіда Балтимора на основі складу нуклеїнових кислот і синтезу мРНК

Як було відмічено раніше, віруси виявляють дивовижну різноманітність щодо їх морфології, структури генома, способу інфікування, круга хазяїв, типів захворювань, що викликаються, і так далі. Хоча кожен з цих властивостей можна використати для поділу вірусів на групи, проте якщо в основу класифікації покласти одну або навіть дві з таких властивостей, це не приведе до системи, в якій вивчення одного вірусу конкретної групи дозволяє зробити узагальнення стосовно інших членів тієї ж самої групи. Крім того, подібна класифікація не створить хорошої основи для уніфікованого обговорення процесу реплікації вірусів.

Для вирішення цієї проблеми, лауреат Нобелівської премії Девід Балтимор в 1971 році запропонував класифікацію вірусів, в основі якої лежить природа їх генома і спосіб їх реп-

лікації і експресії генів. Ця система дозволяє робити висновки і передбачати фундаментальні особливості усіх вірусів в межах кожної групи. Класифікація Д. Балтімора базується на фундаментальному значенні матричних РНК в циклі реплікації вірусу. Віруси не містять молекул, необхідних для трансляції мРНК, і використовують механізми клітини-хазяїна для синтезу своїх білків. З цієї причини віруси вимушені синтезувати мРНК, які розпізнають рибосоми хазяїна. У класифікації Балтімора, віруси групуються згідно з типом геному і використовуваними механізмами синтезу мРНК (мал. 3.1).



Мал. 3.1. Класифікація вірусів за Д. Балтімором.

За прийнятою угодою, усі мРНК називають позитивно-смысловими РНК або (+)РНК. Важливо, що на (+)РНК в клітині хазяїна відразу можуть синтезуватися вірусні білки. Ланцюги РНК або ДНК, які являються комплементом мРНК, називають негативно-смысловими або (-)РНК чи (-)ДНК. З урахуванням сучасних даних в класифікації Д. Балтімора виділяють сім класів вірусів (мал. 3.1).

Клас 1 включає віруси, які мають в геномі дволанцюгову ДНК. Реплікація відбувається в ядрі з використанням ферментів клітини-хазяїна. Проте реплікація членів сімейства вірусів віспи цього класу відбувається в цитоплазмі з використанням ферментів, що кодуються вірусом.

Клас 2 включає віруси з одноланцюговою ДНК. Перед синтезом мРНК ДНК перетворюється в дволанцюгову форму. Реплікація відбувається в ядрі.

Клас 3 включає віруси, геном яких представлений дволанцюговою РНК. Усі відомі на сьогодні віруси цього класу мають сегментований геном. Матрична РНК синтезується на одному з ланцюгів кожного сегменту. Оскільки клітини хазяїна не мають ферментів для синтезу мРНК на геномній РНК-матриці вірусу, ці ферменти повинні кодуватися геномом вірусу і входити до складу віріону.

Клас 4 включає віруси, геном яких представлений одноланцюговою (+)РНК. Фактично геном вірусів цього класу є матричними РНК. Синтез комплементарного ланцюга РНК передує синтезу мРНК. Синтез РНК здійснюється ферментами вірусу, які не входять до

складу вірусної частки, а відразу ж після зараження утворюються при трансляції геномної (+)РНК вірусу.

Клас 5 включає віруси, які мають в геномі одноланцюгову (–)РНК. Синтез мРНК вимагає кодованого вірусом ферменту, який міститься у віріоні. Реплікація відбувається в цитоплазмі або ядрі.

Клас 6 включає віруси, які містять в геномі одноланцюгову (+)РНК. Проте, на відміну від класу 4, перед реплікацією за участю вірусного ферменту зворотної транскриптази на цій РНК синтезується дволанцюгова ДНК.

Клас 7 включає невелику групу вірусів, званих реверсивірусами (reversivirus), які спочатку були віднесені до класу 1, оскільки їх геном представлений дволанцюговою ДНК. Проте їх реплікація здійснюється через стадію формування одноланцюгової РНК, а потім за допомогою зворотної транскриптази вірусу знову синтезується дДНК, яка і служить основою для синтезу мРНК.

Класифікація Балтімора має велике значення. Віруси розподіляються по класах на підставі фундаментальних незмінних характеристик, і встановлення того, до якого класу належить вірус, дозволяє передбачити молекулярні процеси, які відбуваються в клітині при його реплікації. Зокрема, можливо передбачити, чи буде інфекційною сама по собі вірусна нуклеїнова кислота, або потрібні ферменти, які містить віріон.

Недоліком класифікації Балтімора є та обставина, що в ній об'єднуються в класи віруси з однаковими механізмами реплікації, проте не беруться до уваги біологічні особливості вірусів. Наприклад, в клас 1 входять бактеріофаг Т2 і вірус віспи, хоча вони сильно розрізняються по структурі і біології. Так само встановлення того факту, що геном вірусу складається, наприклад, з одноланцюгової (+)РНК, не дозволяє однозначно класифікувати вірус, оскільки він може належати до класу 4 або 6.

Незважаючи на згадані недоліки, класифікація Балтімора широко використовується і є одним з двох прийнятих у вірусології підходів до класифікації цих інфекційних агентів.

3.5. Сучасна класифікація і номенклатура вірусів

Впродовж тривалого часу вірусологи уникали використання в класифікації вірусів таксономічних груп, таких як сімейство, рід або вид, які широко використовуються для класифікації живих організмів. Спроби створити загальноприйнятую класифікацію вірусів привели до консенсусу, і в 1966 році на міжнародному мікробіологічному конгресі в Москві був заснований Міжнародний комітет з номенклатури вірусів, який в 1973 р. був перейменований в Міжнародний комітет таксономії вірусів.

Відповідно до прийнятої класифікації, віруси підрозділяються на родини, підродини, роди і види. Деякі родини вірусів об'єднують в ряди. Більш високі таксономічні одиниці, такі як класи, типи (відділи) або царства, в класифікації вірусів не використовують. Класифікація, що розробляється МКТВ, нагадує класифікацію живих організмів. Проте слід підкреслити, що класифікація вірусів не побудована на основі філогенезу.

При розподілі вірусів по таксономічних групах МКТВ враховує низку характеристик. До їх числа входять круг хазяїв (еукаріоти або прокаріоти, тварини, рослини тощо), морфологічні особливості віріону і природа геномної нуклеїнової кислоти. Враховуються також додаткові особливості, такі як довжина хвоста у фагів, наявність або відсутність певних генів.

Ряд — група родин з деякими загальними характеристиками, назва ряду закінчується на *-virales*. Приклад — ряд *Mononegavirales*.

Родина (підродина) — об'єднує роди, представники яких мають один тип генома і

схожу структурну організацію вірусної частки. Родини (підродини) вірусів позначаються словами, що закінчуються на *-viridae* для родини і *-virinae* для підродини. Приклад — родина *Paramyxoviridae*, підродина *Paramyxovirinae*.

Рід об'єднує віруси на основі структури генома, феномену генетичних взаємовідносин, архітектури віріону, кола сприйнятливих хазяїв, патогенності, географічного поширення, способу передання. Назви родів закінчуються на *-virus*. Приклад – рід *Morbillivirus*.

Особливої згадки заслуговує категорія **виду** у вірусів. Концепція виду складна і невизначена у біології взагалі (немає ніякого єдиного однозначного визначення виду для усіх живих організмів). Тим більше невизначеною вона виявляється стосовно вірусів, які є просто мобільними генетичними елементами.

У 1991 року МКТВ прийняв наступне визначення виду у вірусів: вид вірусів визначається як політетичний клас¹, що утворює низку поколінь, які реплікуються і займають окрему екологічну нішу.

Назва виду має бути максимально короткою і повинна однозначно характеризувати вид і відрізняти його від інших видів. Приклад – *Measles virus* (вірус кору).

У класифікації вірусів не застосовується класична бінарна номенклатура, яку використовують в класифікації живих організмів. Наприклад, в латинській назві вірусу кору (*Measles virus*) не є присутньою назва роду (*Morbillivirus*).

Цифри, букви або їх комбінації можуть бути використані в якості видових епітетів. При описі нових видів, нумерація може бути продовжена. Є припустимими, наприклад, *Bovine adenovirus A*, *Bovine adenovirus B* тощо, або *Human herpesvirus 1*, *Human herpesvirus 2*, *Human herpesvirus 3*. Але є неприпустимими назви на кшталт "11" або "A4"

МКТВ не класифікує таксони вірусів нижче виду, проте в практиці і наукових дослідженнях використовують внутривидову диференціацію вірусів за антигенами, серотипами, генотипами, електрофоретипами — залежно від вживаних методів дослідження.

У останньому 9-му Звіті МКТВ (2012 рік) наведені 2284 видів вірусів, які об'єднані в 349 родів, 19 підродин, 87 родин. Приведені також 6 рядів, до яких віднесено 22 родини. Інші родини до рядів не віднесені. У Звіті наведена також велика кількість видів вірусів, які доки не віднесені до родин або родів.

Окрім вірусів, МКТВ також класифікує віроїди і пріони.

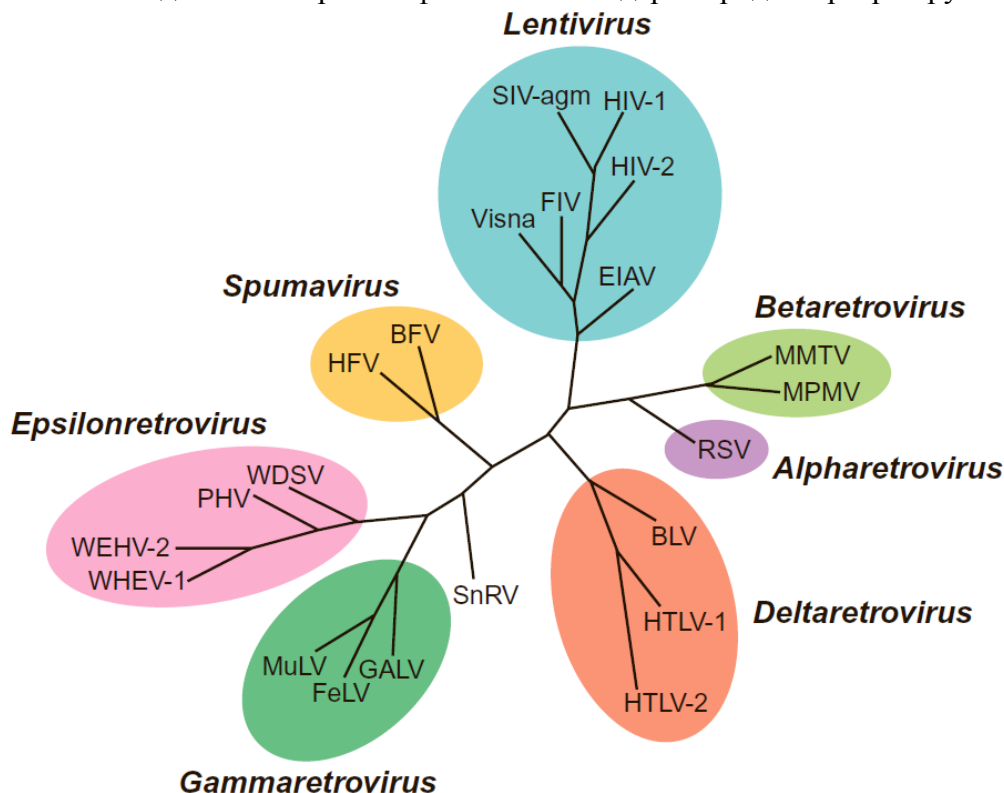
3.5.1. Класифікація вірусів з урахуванням нуклеотидних послідовностей геномів

При сучасному розвитку методичної бази вірусологічних досліджень, фактично рутинною процедурою є отримання даних стосовно послідовностей нуклеотидів в окремих генах або повних геномах вірусів (секвенування геномів) і визначення будови їх геномів. Це дозволяє отримати також відомості стосовно послідовності амінокислот, з яких складаються білки, що кодуються цими генами. Ступінь спорідненості між вірусами може бути оцінена з використанням комп'ютерних програм і наведена у вигляді діаграм, які знані як філогенетичні дерева, оскільки вони показують вірогідні філогенетичні зв'язки між вірусами.

Філогенетичні дерева можуть бути різних типів. Зокрема, вони можуть бути вкорінені або не вкорінені. Вкорінені починаються з кореня, який, як припускають, є предком інших

¹ Політетичний клас – той, що має великий набір ознак, більшість з яких є у кожного представника даного класу, але немає жодної ознаки, яку обов'язково повинен мати кожний представник класу.

вірусів філогенетичного дерева. Для не вкорінених дерев відсутні припущення щодо предка. На мал. 3.2. наведено не вкорінене філогенетичне дерево родини ретровірусів.



Мал. 3.2. Філогенетичний аналіз консервативних регіонів гена зворотної транскриптази вірусів родини *Retroviridae*. HIV1 і HIV2 – віруси імунodefіциту людини 1 і 2 відповідно. Малюнок наведений за джерелом 2 у списку додаткового читання до глави 3.

Після вивчення цієї глави ви повинні:

- Знати критерії, які використовують у класифікації вірусів
- Правильно писати латинські назви рядів, родин і родів вірусів
- Знати підґрунтя, на якому базується класифікація вірусів за Д. Балтімором
- Охарактеризувати сім класів (груп) вірусів, які виділяє класифікація Д. Балтімора
- Дати визначення виду вірусів
- Знати основу внутрішньовидової диференціації вірусів

Додаткове читання до глави 3.

1. Сайт Міжнародного комітету таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV): <http://ictvonline.org/index.asp?bhcp=1>
2. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Ed.) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – 2012.– Elsevier Academic Press: Amsterdam. ISBN 978-0-12-384684-6.x.– 1327 p.
3. van Regenmortel M.H., Mahy B.W. Emerging issues in virus taxonomy // Emerg. Infect. Dis.- 2004.–V.10, №1.–P.8–13.

Глава 4. Цикл реплікації вірусів

Віріони є інертною формою вірусу, яка не розмножується і не виявляє ніякої метаболічної активності. Для відтворення потомства вірусу необхідно потрапити всередину клітини хазяїна, синтезувати копії своєї нуклеїнової кислоти і своїх білків, здійснити збирання нових віріонів і вихід їх з клітини. З точки зору молекулярних і біохімічних подій, на рівні окремої клітини цикл реплікації вірусу зручно розділити на сім етапів:

1. Прикріплення вірусу до поверхні клітини;
2. Вхід вірусу в клітину і декапсидація («роздягання») вірусного геному шляхом повного або часткового видалення білків капсиду;
3. Транскрипція генів вірусів (синтез матричних РНК);
4. Трансляція вірусних мРНК (синтез вірусних білків);
5. Реплікація нуклеїнової кислоти генома;
6. Збирання білків і геномних нуклеїнових кислот у віріони;
7. Вихід віріонів з клітини.

Приведена схема представляє зручний шаблон для розгляду циклу реплікації вірусів. Слід, проте, мати на увазі, що є значні відмінності, пов'язані з типом клітин, що заражаються, і типом вірусу. Наприклад, у вірусів рослин відсутні етапи 1 і 2. Слід також пам'ятати, що деякі з цих етапів проходять не строго в наведеній послідовності; у багатьох вірусів транскрипція, трансляція, реплікація генома, збирання віріонів і вихід з клітини відбуваються в один і той же час. Також деякі віруси мають додаткові етапи в циклі реплікації.

Інфекційний процес починається тоді, коли разом зустрічаються вірусна частка і клітина-мішень, проте така зустріч відбувається по-різному у бактеріофагів, вірусів рослин і вірусів тварин. Первинна взаємодія вірусів тварин з клітинами тварин відбувається в результаті простої дифузії, оскільки розміри вірусної частки малі, і вона в рідкому середовищі знаходиться в постійному Броунівському русі. Ймовірно, бактеріофаги зустрічаються з клітинами бактерій також в результаті дифузії. Інакше стоїть справа з вірусами рослин, які у більшості випадків безпосередньо вносяться у цитоплазму рослинної клітини завдяки активності переносників, що містять віруси, або внаслідок механічних ушкоджень.

Слід звернути увагу, що вірусні частки – віріони – є стабільними структурами, цілісність яких підтримується мережею міжмолекулярних взаємодій. Віріони досить стійкі до стресових дій зовнішнього оточення або позаклітинного середовища протягом передавання від клітини до клітини і від одного хазяїна до іншого. Проте їх стабільність повинна бути оборотною, оскільки протягом зараження нової клітини відбувається часткове або повне розбирання вірусної частки і вивільнення геному і потрібних вірусу білків. Таким чином, зв'язки, які стабілізували частку, мають бути розірвані, капсид повинен відкритися, а геномна нуклеїнова кислота прийняти неконденсовану форму. Щоб це стало можливим, ціла вірусна частка або її специфічні білки повинні фіксуватися у метастабільній конформації у складі віріона, але швидко зазнавати конформаційних змін, які запускаються при вході вірусу до клітини. Така програма конформаційних змін «вбудовується» у віріон при його збиранні, що дозволяє вірусній частці зазнавати конформаційних змін без потреби у зовнішніх джерелах енергії.

4.1. Вхід до клітини

Вхід вірусу до клітини і декапсидація у типовому випадку відбуваються шляхом декіль-

кох контрольованих послідовних кроків. Протягом реалізації програми входу, вірусна частка зазнає змін, які призводять до низки подій, таких як проникнення у клітину, дестабілізація капсиду і роздягнення геному. Багато з цих подій є наслідком конформаційних змін метастабільних структур віріону. Такі зміни ініціюються зв'язуванням з рецепторами, дією низького рН, переміщенням у відновлюване оточення, індукованими ферментами ковалентними модифікаціями та іншими сигналами клітини-хазяїна. Віруси використовують ці сигнали не тільки задля індукції змін у віріоні і дисоціації білкових субодиноць, але й заради координації переміщення з одного місцерозміщення у клітині до іншого, що гарантує, що кожний етап програми декапсидації буде відбуватися у вірній послідовності у вірний час і вірному місці.

Клітина, яку вірус уражує, у свою чергу реагує на сигнали, які ініціює вірус. Простим прикріпленням до рецепторів багато вірусів «відчиняють двері» у клітину за допомоги активації каскадів клітинних сигналів. Часто така активація є важливою, оскільки запускає процеси, наприклад ендоцитоз, які є ключовими у вході вірусу до клітини.

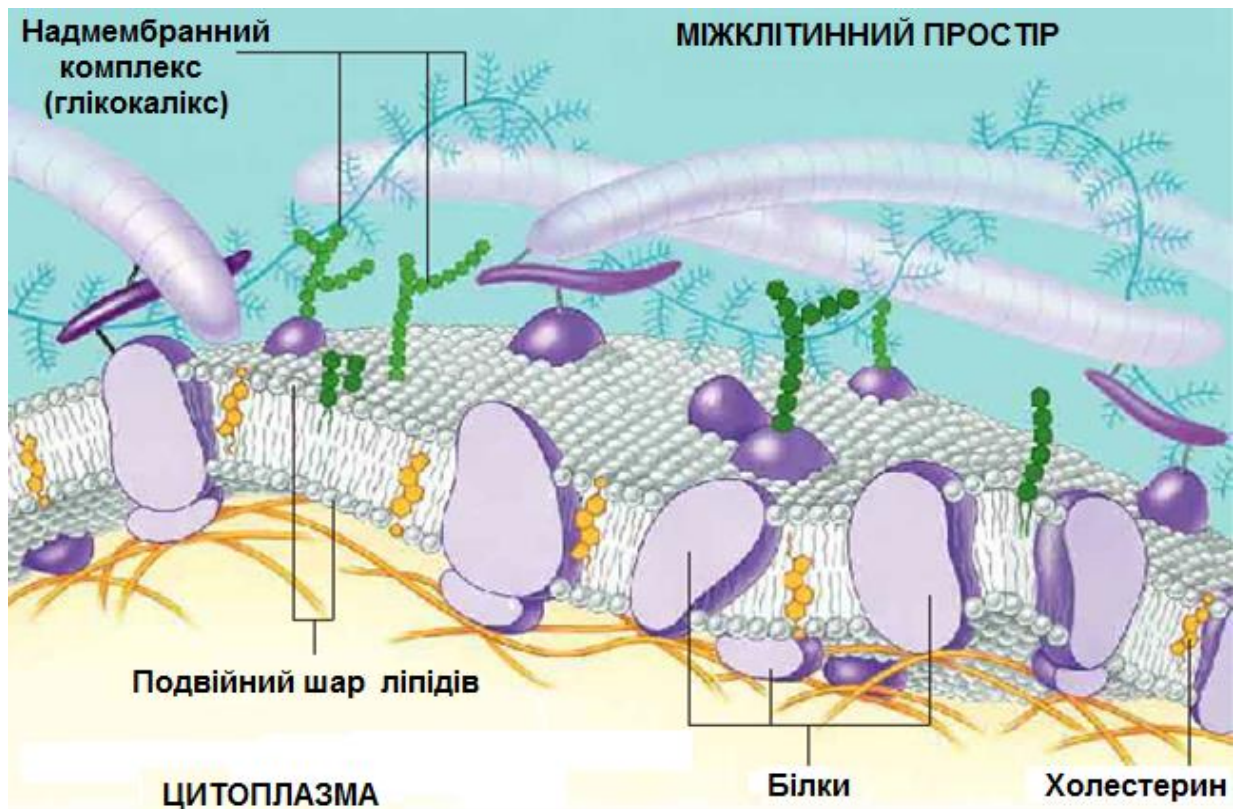
4.1.1. Віруси тварин – прикріплення

Клітини тварин оточені ліпідним бішаром – плазматичною мембраною. У плазматичній мембрані «заякорені» молекули глікопротеїнів і гліколіпідів, які формують на зовнішній поверхні клітини свого роду «ворс», так званий глікокалікс. Молекули глікокаліксу забезпечують міжклітинні взаємодії і адгезію, виконують функції рецепторів, транспортерів і багато інших (мал. 4.1).

Для прикріплення і проникнення віруси використовують складники клітини, і якщо клітина не експресує на своїй поверхні молекулу, яка служить рецептором для певного вірусу, вона не може заразитися цим вірусом.

Технічно прикріплення вірусу складається із специфічної взаємодії вірусного білку, що зветься «антирецептором» або «білком прикріплення», з молекулою рецептора клітини. Тут важливо не допустити плутанини в термінології. Не можна говорити про рецептори, які є у вірусів. У вірусів немає рецепторів, у них є білки прикріплення або антирецептори. А ось клітина-хазяїн має рецептори, з якими можуть зв'язуватися віруси. Ці рецептори називають рецепторами вірусів. Але це не рецептори, які мають віруси.

Зв'язування білку прикріплення з рецептором відбувається за принципом комплементарності і є дуже специфічним: вірус може заражати тільки ті клітини, на поверхні яких є відповідний рецептор. Відповідність клітинних рецепторів і вірусних білків прикріплення визначає **тропізм** вірусу (від грець. *τροπος* — «поворот», «напрямок»), тобто здатність вибірково вражати певні клітини. Тропізм вірусу – здатність вірусів заражати клітини певного виду або типу; коло клітин-хазяїв обмежується тими клітинами, які експресують рецептори, використовувані вірусами для проникнення в клітину. Термін «тропізм» еквівалентний термінам «органотропність» або «тканинна специфічність». Наприклад, віруси, що вражають печінку, називають гепатотропними, віруси, що репродукуються в клітинах нервової системи, називають нейротропними тощо.



Мал. 4.1. Глікокалікс — «заякорені» в плазматичній мембрані молекули оліго— і полісахаридів, глікопротеїнів і гліколіпідів.

Таким чином, віруси прикріплюються до клітин тварин за посередництва рецепторних молекул, що знаходяться на поверхні клітини. Зазвичай такими рецепторами служать білки, але іноді рецепторами можуть виступати вуглеводи і дуже рідко ліпіди. Взаємодія вірусу з рецептором клітини є високо специфічною, проте в межах сімейства віруси можуть використати той самий рецептор. Одним важливим виключенням є модифікований вуглевод, *N*-ацетилнейрамінова кислота, яка часто утворює термінальні залишки вуглеводних груп глікопротеїнів і гліколіпідів і править за рецептор вірусам різних сімейств.

Отже, природа не створила для вірусів спеціальних рецепторів на поверхні сприйнятливих клітин. Вони використовують клітинні білки і інші молекули, що виконують різноманітні функції. Для низки вірусів рецепторами є мембранні молекули інтегринового суперсімейства. Інтегрини — молекули адгезії, що знаходяться на поверхні клітин і пов'язані з цитоскелетом. Вони є гетеродимерами (складаються з двох ланцюгів — α і β). Ідентифіковані близько 20 членів цього суперсімейства, які утворюються за рахунок різних комбінацій α - і β -ланцюгів. Для інших вірусів рецепторами є молекули адгезії або молекули імуноглобулінового суперсімейства. Так, головним рецептором для ВІЛ-1 і ВІЛ-2 є молекула CD4, для риновірусів — молекула адгезії ICAM-1, для поліовірусів — CD44 антиген.

Окрім білків, рецепторами вірусів можуть виступати вуглеводи, наприклад згадана вище *N*-ацетилнейрамінова кислота. Коли вона виявляється останнім вуглеводним залишком у вуглеводному ланцюзі глікопротеїнів або гліколіпідів, вона може слугувати у якості рецептора для вірусів грипу і вірусів деяких інших сімейств. Звичайнісінький компонент ліпідних мембран — фосфатидилсерин — править за рецептор для вірусу везикулярного стоматиту.

Приклади молекул поверхні клітин тварин, які віруси використовують як рецептори, наведені в таблиці нижче.

Молекула	Нормальна функція	Вірус	Тип рецептора
ICAM-1	Зчеплення з іншими клітинами через CD54	Більшість риновірусів	Первинний
CAR (рецептор Коксакі-аденовірусів)	Унікальний білок з невідомою функцією	Багато аденовірусів, віруси Коксакі	Первинний
$\alpha\beta_x$ інтегрин	Зчеплення з іншими клітинами через вітронектин	Аденовіруси	Корецептор
$\alpha\beta_6$ інтегрин	Зчеплення з іншими клітинами через вітронектин	Вірус ящура	Первинний
CD4	Ліганди для МНС* II Т-хелперних клітин	ВІЛ-1, ВІЛ-2, SIV	Первинний
CCR5	Білок з 7 трансмембранними доменами, який зв'язує С-С хемокіни	ВІЛ-1, ВІЛ-2, SIV	Корецептор
CXCR4	Білок з 7 трансмембранними доменами, який зв'язує С-Х-С хемокіни	ВІЛ-1, ВІЛ-2, SIV	Корецептор
Вірус-специфічний IgG	Зв'язується з вірусом	Вірус лихоманки Денге	Первинний
N-ацетилнейрамінова кислота (термінальний залишок)	Залишок у вуглеводному ланцюзі глікопротеїнів і гліколіпідів	Віруси грипу А, В, С і віруси деяких інших сімейств	Первинний
Фосфатидилсерин	Компонент ліпідної мембрани	Вірус везикулярного стоматиту	Первинний
*МНС (major histocompatibility complex) – головний комплекс гістосумісності			

Перелік ідентифікованих рецепторів для вірусів надзвичайно великий і постійно поповнюється новими членами.

Вірусні білки прикріплення часто (але не завжди) утворюють виступи на поверхні віріона, проте власне антирецептор (функціональна частина молекули білку прикріплення), як правило, екранований від випадкових взаємодій і знаходиться в заглибленні. В якості прикладів білків прикріплення вірусів людини і тварин, що виступають над поверхнею віріона, можуть бути наведені гемаглютинін вірусу грипу, VP4 ротавірусу, фімбрії аденовірусів. У ентеровірусів антирецептор знаходиться на дні так званих каньйонів — поглиблень на поверхні капсиду.

Сили, які зв'язують сайт прикріплення вірусу з рецептором клітини, включають водневі зв'язки, іонні взаємодії і сили Ван-дер-Ваальса. Ніяких ковалентних зв'язків між віріоном і рецептором не утворюються.

Низка вірусів зв'язується з різними типами молекул рецепторів в певній послідовності. Ця послідовність представлена рецепторами з низькою спорідненістю, первинними рецеп-

торами і корецепторами, або вторинними рецепторами. Спочатку віруси зв'язуються з рецепторами, що мають низьку спорідненість до білку зв'язування. Цей тип рецепторів у великій кількості представлений на клітинній поверхні і має низьку специфічність і низьку спорідненість до вірусних часток. Ці рецептори служать для виймання вірусів з рідкого оточення і встановлення прямого контакту вірусу з поверхнею клітини. В якості цих перших рецепторів низка вірусів, включаючи ВІЛ-1, використовують гепарани (біологічно активні полісахариди, які існують тільки у вигляді сульфатів), тоді як інші віруси використовують інший цукор, *N*-ацетилнейрамінову кислоту. Це зв'язування часто є оборотним, і вірус може від'єднатися від клітини.

Далі вірус зв'язується з іншими молекулами поверхні клітини, первинними рецепторами і корецепторами, що призводить до міцного безповоротного закріплення вірусної частки і зараження. Рецептори розподілені в мембрані клітини дифузно. Рухливість (плинність) білково-ліпідного шару мембрани визначає можливість концентрації рецепторів в обмеженій ділянці. Така концентрація сприяє утворенню множинних зв'язків між рецепторами і антирецепторами, які потрібні для необоротної адсорбції вірусу. Кількість молекул рецептора в ділянці адсорбції вірусу може досягати декількох тисяч.

Деякі віруси, проте, використовують єдиний тип рецептора. Наприклад, *N*-ацетилнейрамінова кислота є єдиним рецептором для вірусів грипу.

Цікавим випадком є використання вірусом специфічних по відношенню до нього антитіл в якості додаткового рецептора. Антитіла зв'язуються своїми константними регіонами з Fс-рецепторами². За наявності специфічного антитіла, вірус використовує його як додатковий рецептор і інфікує клітину. Цей процес називається залежним від антитіл підвищенням інфективності³. Таке явище часто спостерігається в культурах клітин, але рідко відбувається *in vivo*. Класичним прикладом такого випадку *in vivo* є вірус лихоманки Денге. Вірус лихоманки Денге передається комарами і при первинному зараженні викликає середньої тяжкості гарячковий стан, схожий з грипом, або не викликає ніяких симптомів. Віруси циркулюють в крові інфікованих людей впродовж 2–7 днів — приблизно впродовж цього ж часу триває лихоманка. Після первинного зараження у людини залишаються антитіла до вірусу, і при повторному зараженні, використовуючи антитіла як рецептори, вірус заражає моноцити і макрофаги. Активна реплікація вірусу в цих клітинах може призводити до серії вторинних реакцій (активація комплементу, кінінової системи та ін.) і до розвитку тромбогеморагічного синдрому, що призводить до загрозової для життя геморагічної лихоманки Денге або шокового синдрому Денге. У хворого підвищується проникність і крихкість капілярів, знижується вміст тромбоцитів, розвивається кровотеча внаслідок недостатності деяких чинників системи згортання крові. Геморагічні прояви виникають не лише в шкірі, слизових оболонках, але і у внутрішніх органах: ендо— і перикардії, плеврі, очеревині, слизовій оболонці шлунку, кишечнику, головному мозку.

Прикріплення вірусу до рецепторів на поверхні клітини запускає низку подальших подій. Так, деякі віруси для проникнення використовують додаткові рецептори. Переміщуючись латерально у мембрані, рецептори стикаються з прикріпленим вірусом і встановлюють з

² Fс-рецептор — білок, розташований на поверхні декількох видів клітин імунної системи (природних кілерів, макрофагів, нейтрофілів і огрядних клітин), бере участь в захисних реакціях.

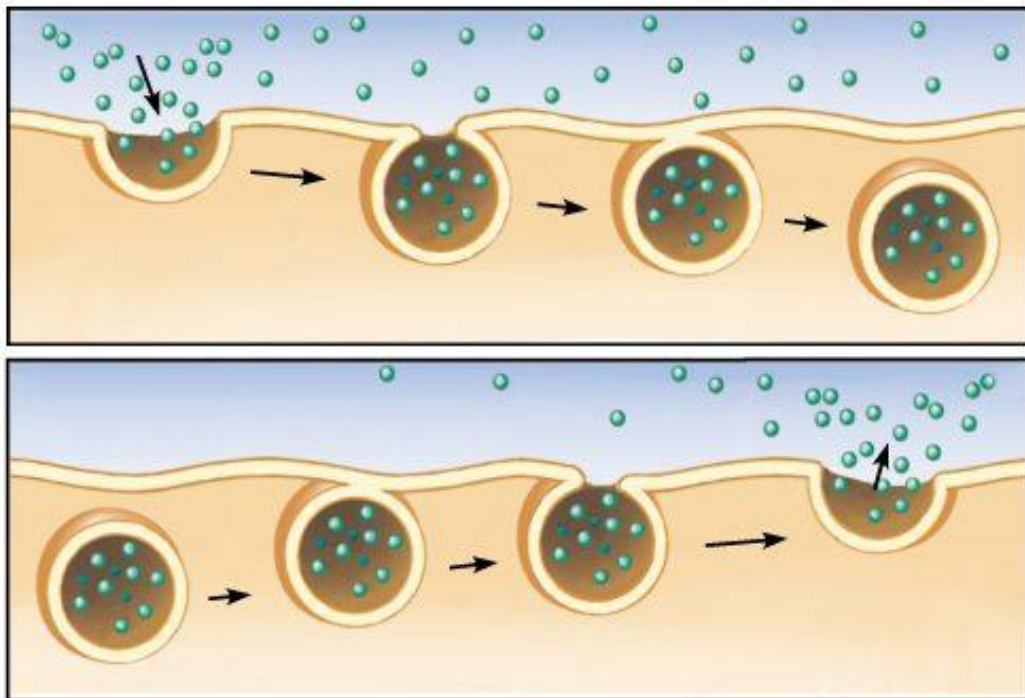
³ Інфективність — здатність мікроорганізму або вірусу проникати в організм людини, тварини чи рослини.

ним додаткові зв'язки. Коли з вірусом зв'язується деяке остаточне число рецепторів, це служить сигналом початку процесів проникнення; окрім цього, наявність деякого необхідного набору рецепторів дозволяє вірусу знаходити вірні клітини-мішені. Взаємодія з рецепторами готує вірусну частку до введення вірусного генома в цитоплазму клітини хазяїна, спричиняючи зміни конформації білків оболонки та/або капсиду.

4.1.2. Віруси тварин – проникнення

Після прикріплення до рецепторів, віруси тварин повинні перетнути плазматичну мембрану, щоб доставити геном всередину клітини хазяїна. На відміну від прикріплення, проникнення вірусу в клітину є енергозалежним процесом, тобто клітина має бути метаболічно активна, щоб воно могло статися.

Плазматична мембрана, що оточує клітину, є дуже мобільною і активною структурою. Клітини постійно поглинають деякі фрагменти свого безпосереднього оточення за допомогою ендоцитозу, або здійснюють зворотний процес експорту речовин з клітини в процесі екзоцитозу (мал. 4.2).



Мал. 4.2. Схематичне зображення ендоцитозу (вгорі) і екзоцитозу (внизу).

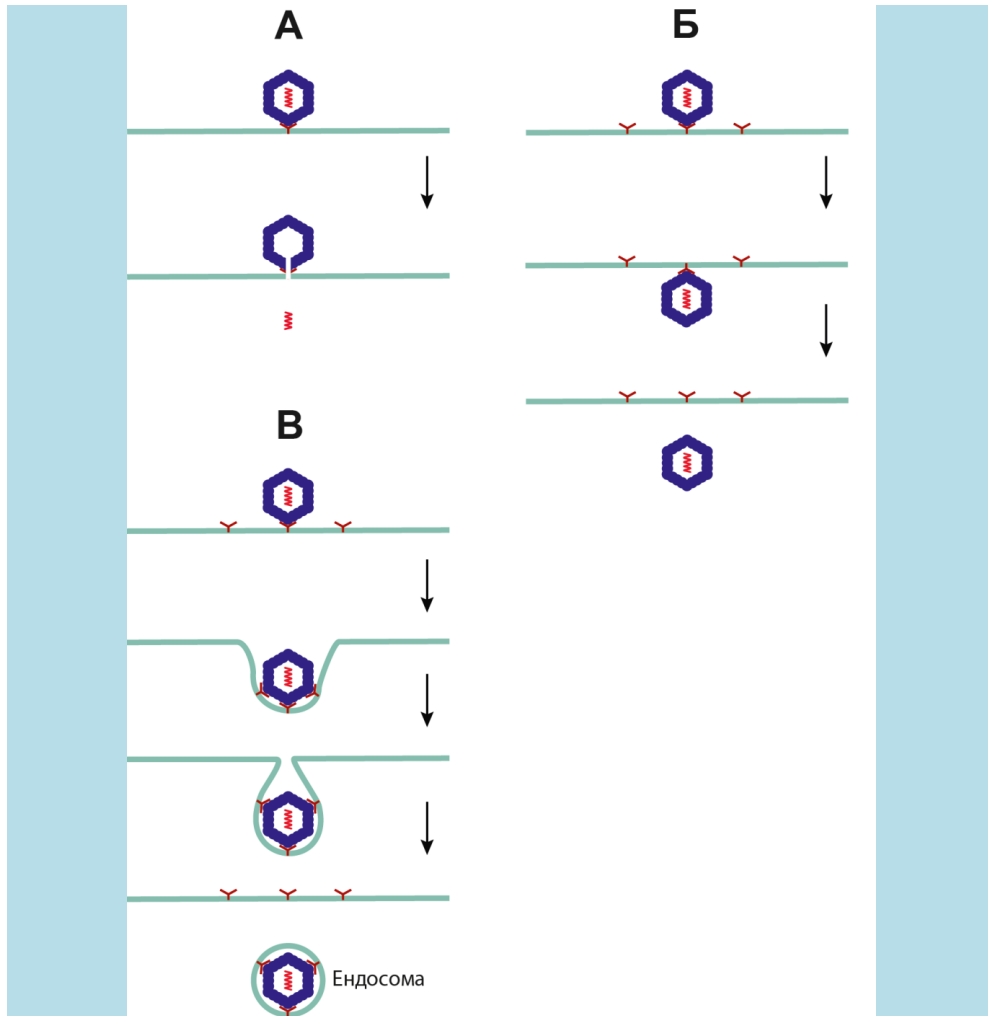
Ендоцитоз використовується клітиною для виконання численних функцій, серед яких поглинання поживних речовин, захист від патогенів і передача сигналів гормонів, які зв'язуються з рецепторами на поверхні клітин.

Існують декілька механізмів ендоцитозу, до числа яких входить залежний від клатрина ендоцитоз і залежний від кавеоліна ендоцитоз. Клітинні білки клатрин і кавеолін, що покривають деякі ділянки плазматичної мембрани клітини з внутрішньої сторони, обумовлюють необхідну кривизну вгинання мембрани, сприяючи утворенню ендоцитозних везикул. Багато вірусів, такі як аденовіруси, зазнають ендоцитоз через покритий клатрином регіон мембрани. Віріони опиняються в покритих клатрином ендосомах; проте незабаром ці ендосоми втрачають клатрин. У інших вірусів, таких як вірус приматів 40 (SV40), ендоцитоз відбувається через ділянки мембрани, покриті кавеоліном; зрештою ці віруси опиняються

в покритих кавеоліном ендосомах. Нарешті, ендоцитоз низки вірусів не залежить від клатрина або кавеоліна.

4.1.2.1. Проникнення в клітину вірусів, що не мають оболонки

Є можливим, що деякі віруси, що не мають ліпопротеїнової оболонки, доставляють свої геноми в клітину хазяїна через пору в плазматичній мембрані; у такому випадку капсид залишається зовні клітини (мал. 4.3А). Іноді спостерігається переміщення повної вірусної частки через цитоплазматичну мембрану клітини (мал. 4.3Б). Цей процес протікає відносно рідко і є погано зрозумілим. Він може бути опосередкований білками капсиду вірусу і специфічними мембранними рецепторами. Таким шляхом потрапляють в клітини епітелію шлунково-кишкового тракту деякі ротавіруси.



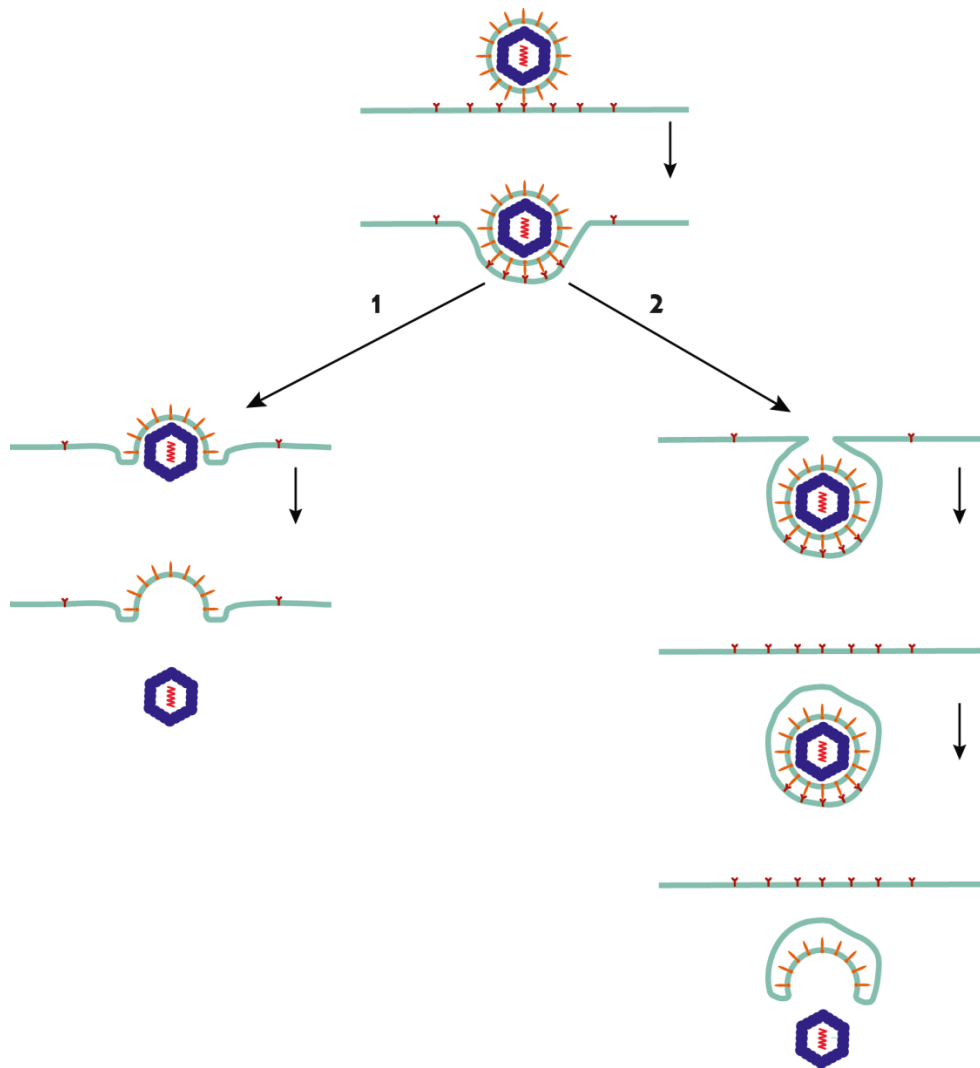
Мал. 4.3. Механізми проникнення в клітину вірусів, що не мають оболонки. **А** – після прикріплення віріона до рецептора або рецепторів на поверхні клітини, в капсиді ймовірно утворюється канал, а в плазматичній мембрані пора, через які геном переходить в цитоплазму клітини. **Б** – переміщення повної вірусної частки через цитоплазматичну мембрану клітини. Цей процес протікає відносно рідко і є погано зрозумілим. **В** – опосередкований рецепторами ендоцитоз вірусу у внутрішньоклітинну вакуоль (ендосому).

Нарешті, найчастіше спостережуваним для вірусів без оболонки механізмом проникнення в клітину є обумовлений рецепторами ендоцитоз (мал. 4.3В). Вміст ендосоми, проте, є частиною зовнішнього оточення клітини, і віріон у ендосомі все ще знаходиться не в цитоплазмі. Механізми, за допомогою яких віріони і їх геноми вивільняються з ендосоми, не

є повністю зрозумілими. Ймовірно, вивільнення генома в цитоплазму залежить від конформаційних змін білків віріона, які можуть ініціюватися зв'язуванням вірусу з рецепторами у везикулі та/або змінами внутрішнього рН везикули. Ендосоми, що містять віріони, можуть зливатися з іншими везикулами, такими як лізосоми, які мають рН 4,8–5,0; це знижує рН усередині ендосоми з віріоном. Подальше зниження рН може відбуватися за рахунок закачування протонів пов'язаними з мембраною ендосоми АТФазами (протонними помпами). Пониження рН призводить до конформаційних змін білків віріона, в результаті яких вивільняється раніше прихований гідрофобний регіон білку. Цей регіон вбудовується в мембрану везикули і утворює канал, через який геном і асоційовані з ним білки виходять в цитоплазму.

4.1.2.2. Вхід в клітину вірусів, покритих оболонкою

Після приєднання до клітинних рецепторів вірусів, віріони яких оточені ліпідною оболонкою, можуть відбуватися дві події: або оболонка віріона зливається з плазматичною мембраною, або відбувається опосередкований рецепторами ендцитоз, і оболонка віріона зливається з мембраною ендосоми (мал. 4.4). Обидві ці події включають процес злиття оболонки віріона з мембраною клітини (з плазматичною мембраною або з мембраною везикули). Злиття мембран є універсальним біологічним явищем, яке відбувається при безлічі процесів, від запліднення до транспорту мембранних везикул усередині клітини. Проте ліпідний бішар є стабільною структурою, і злиття ліпідних мембран не відбувається спонтанно. Кожен оточений оболонкою вірус має спеціалізовані глікопротеїни, які і відповідають за злиття мембран. Процес злиття мембран може залежати від низького рН, як це спостерігається у вірусів грипу, або бути незалежним від рН, як у вірусів герпесу або ВІЛ.



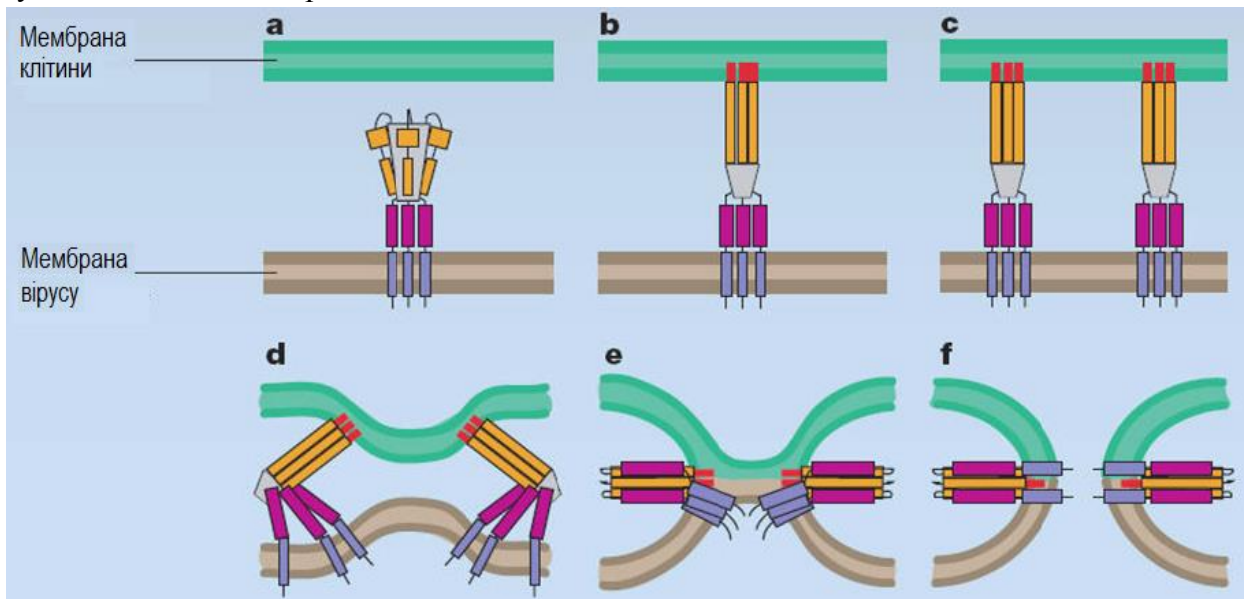
Мал. 4.4. Механізми входу в клітину вірусів, покритих оболонкою. Пояснення див. в тексті.

Для того, щоб злиття мембран сталося, бішари оболонки вірусу і мембрани клітини мають бути розірвані в деякій загальній точці, так що їх гідрофобні внутрішні частини опиняться в невідповідному оточенні, і потім переформуються в якості єдиного бішару. До теперішнього часу не зовсім ясно, як це відбувається. Найбільша кількість інформації є стосовно ВІЛ-1 (мал. 4.5). Частка ВІЛ-1 зливається безпосередньо з ліпідним бішаром плазматичної мембрани. Злиття бішару оболонки ВІЛ-1 з плазматичною мембраною ініціюється успішною взаємодією вірусу з рецепторами. Ця взаємодія запускає конформаційні зміни у білку оболонки, які призводять до виставлення гідрофобних термінальних сегментів білку оболонки віріона gr41. Цей білок є тримером, який заякорений в оболонці вірусу, і в нормі його гідрофобні частини займають приховане положення біля мембрани віріона. Після конформаційних змін ці N-термінальні гідрофобні частини вставляються в ліпідний бішар клітинної мембрани. Далі невелике число молекул gr41 формують гідрофобний канал між двома мембранами, зближують бішари так, що вони з'єднуються і формують перемичку. Нарешті, перемичка розривається, бішари вірусу і мембрани клітини з'єднуються, і утворюється пора, яка збільшується в розмірах до величини, необхідної для проходження в цитоплазму генома вірусу і пов'язаних з ним білків.

4.1.2.3. Віруси тварин – внутрішньоклітинний транспорт і роздавання

Після надходження до клітини, багато вірусів або, принаймні, їх геноми мають бути доставлені в конкретне місце усередині клітини. Реплікація більшості РНК-геномних вірусів

еукаріот здійснюється в цитоплазмі, оскільки їх геноми кодують усі необхідні ферменти для реплікації, і у вірусів немає потреби у ферментах ядра клітини-хазяїна. Виключенням є вірус грипу, якому потрібні клітинні механізми сплайсингу. Тому геном вірусу грипу має бути доставлений в ядро.



Мал. 4.5. Передбачуваний механізм злиття плазматичної мембрани клітини-хазяїна і мембрани оболонки віріона ВІЛ-1 за участю вірусного білку злиття gp41. Буквами від а до f позначені послідовні етапи злиття мембран.

Ретровіруси теж є РНК-вірусами, реплікація геномів яких відбувається в ядрі. У цитоплазмі їх РНК-геном копіюється у форму ДНК, і більшість ретровірусів чекають в цитоплазмі настання мітозу. Впродовж мітозу ядерна оболонка тимчасово руйнується і вірусна ДНК з асоційованими білками може потрапити в ядерний компартмент. Таким чином, ці віруси можуть реплікуватися тільки в клітинах, що діляться. Проте у низки ретровірусів їх ДНК з асоційованими білками може транспортуватися в інтактні ядра. Завдяки цьому такі віруси (до яких належить ВІЛ) можуть реплікуватися і в клітинах, що не діляться.

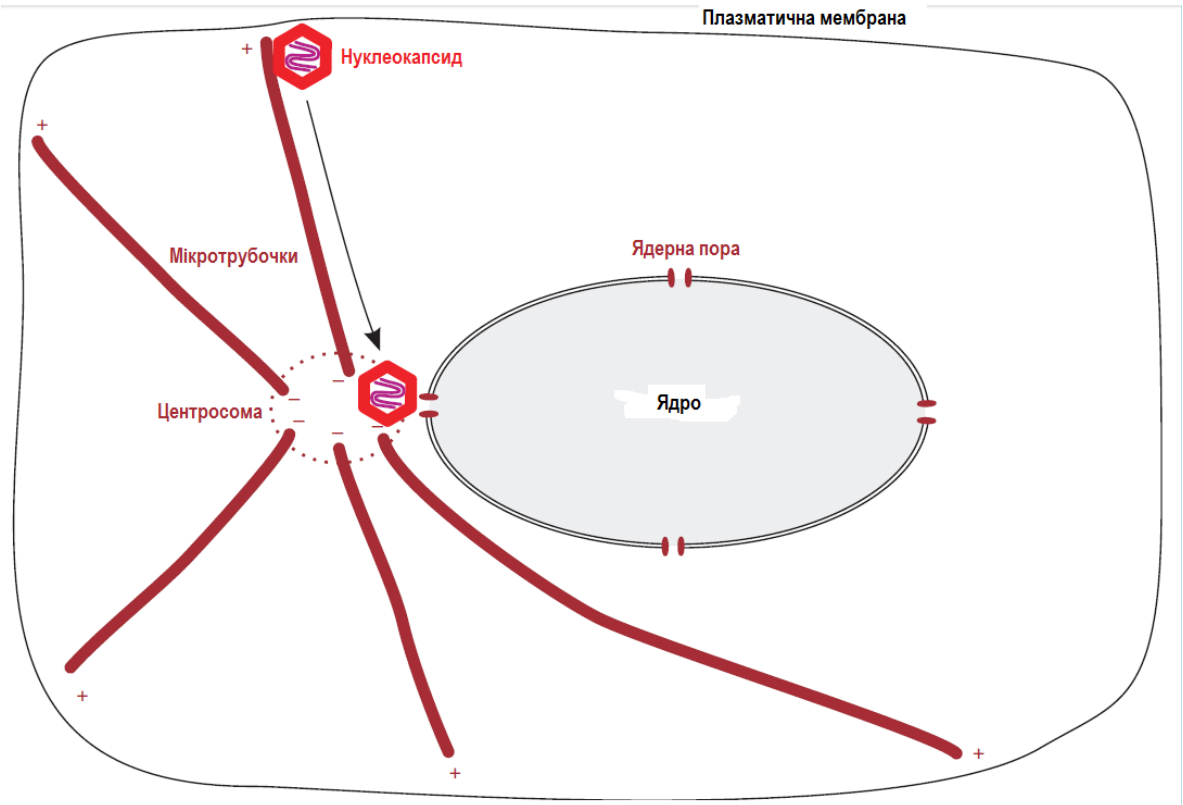
Деякі віруси з ДНК-геномами, такі як іридовіруси і поксвіруси, реплікуються в цитоплазмі клітин еукаріот, проте більшість ДНК-геномних вірусів реплікуються в ядрі. У цих вірусів, як і вірусів грипу і ретровірусів, геноми повинні транспортуватися до ядерної оболонки і потім перетнути її. Для транспортування, структурні білки цих вірусів мають послідовності, що дозволяють їм зв'язуватися з мікротрубочками.

Мікротрубочки є компонентом цитоскелета, який може використовуватися у вигляді напрямної для переміщення внутрішньоклітинних складників, таких як органели, в певні ділянки клітини. Кінці мікротрубочок означають як плюс і мінус. У більшості клітин тварин плюс-кінці розташовані біля плазматичної мембрани, тоді як мінус-кінці прикріплені до структури, яку називають центросомою, або центром організації мікротрубочок, і яка розташована біля ядра клітини (мал. 4.6). Мікротрубочки є порожнистими циліндрами, 25 нм діаметром, і складаються з білків α - і β -тубуліна.

Уздовж мікротрубочок можуть переміщатися клітинні білки, що називаються моторними білками (дінеїни, кінезини, актин та ін.). Ці моторні білки можуть не лише переміщатися самі по собі, але і здатні переміщати асоційований з ними вантаж. Таку систему внутрішньоклітинного транспорту експлуатує ціла низка вірусів (до числа яких належать віруси

герпесу, аденовіруси, парвовіруси і ретровіруси) для доставки їх нуклеокапсидів або похідних від нуклеокапсидів структур від периферії цитоплазми до ядра. Вірусні структури транспортуються із швидкістю 1–4 мкм в секунду.

Оболонка ядра складається з двох мембран (зовнішньої і внутрішньої). Ядерна оболонка пронизана порами, в яких зовнішня і внутрішня мембрана переходять одна в іншу. На ядрі типової зростаючої клітини є від 3000 до 5000 пір. Ядерні пори діють як воротарі, контролюючи транспорт матеріалів в/з ядра.



Мал. 4.6. Транспорт нуклеокапсиду уздовж мікротрубочок. Нуклеокапсид транспортується від плюс кінця мікротрубочки, розташованого біля плазматичної мембрани, до центросоми, яка розташована поблизу від ядра.

Кожна ядерна пора складається з комплексу, який формують більш ніж 50 видів білків, які контролюють переміщення матеріалів через пору. У центрі пори є канал, через який можуть дифундувати невеликі молекули, проте більшість молекул і часток проходять через пору за посередництва спеціальних білків (імпортинів і експортинів). Через канал пори можуть проходити частки до 25 нм діаметром. Невеликі нуклеокапсиди/віріони, подібні до віріонів парвовірусів, можуть проходити через пору повністю, проте віруси з більшими віріонами повинні частково або повністю позбутися капсиду біля ядерної пори.

Незалежно від природи вірусної частки, геном вірусу потрапляє в цитоплазму зазвичай у вигляді нуклеопротеїнової структури, часто із залишковими компонентами білків капсиду, а не у вигляді голої нуклеїнової кислоти. Вірусні білки, що асоціюються з геномом, включають ферменти синтезу нуклеїнових кислот і внутрішні структурні білки, що утворюють ядро (кор) складно влаштованих віріонів. Таким чином, після попадання в клітину у деяких вірусів може відбуватися вторинне роздягання (декапсидація) вірусного нуклеокапсиду усередині клітини, впродовж якого деякі вірусні білки віддаляються або перебудовуються.

Роздягання вірусу можна визначити як повне або часткове видалення капсиду з вивільненням геному вірусу. Залежно від виду вірусів, цей процес може відбуватися:

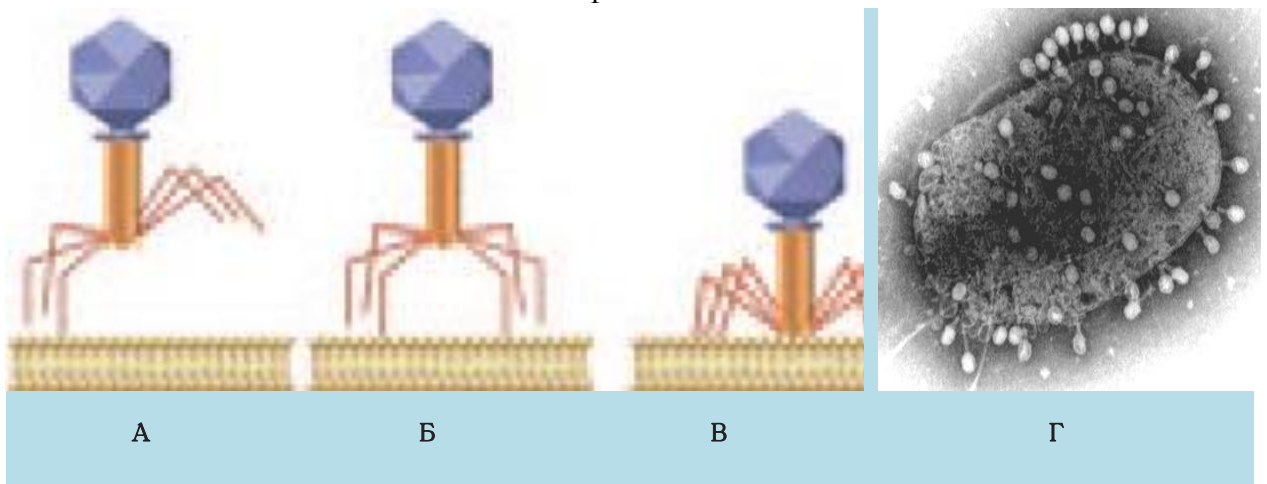
- на поверхні клітини; капсид залишається на зовнішній поверхні клітини;
- у цитоплазмі;
- біля ядерної пори;
- усередині ядра.

4.1.2.4. Низька ефективність інфекційного процесу.

Одним з вражаючих аспектів зараження клітин тварин вірусами є низька ефективність цього процесу. Внутрішньоклітинні захисні системи, такі як ферменти лізосом, можуть інактивувати вірус до або після проникнення. Наприклад, при зараженні поліовірусами (збудники поліомієліту), основна частина РНК вірусу руйнується після початку взаємодії вірусу з клітинами. Це відбувається з кількох причин, до числа яких входить невдача у взаємодії вірусу з клітиною, що не дозволяє завершити процес входу вірусу в клітину. Таким чином, замість вивільнення геномної РНК в цитоплазму і її асоціації з рибосомами і далі з білком-репліказою, РНК вірусу руйнується рибонуклеазами. Подібні невдачі пояснюють, чому відношення загальної кількості вірусних часток до числа часток, що викликали зараження, виявляється біля 1000:1 (тобто в середньому з 1000 часток тільки одна успішно заражає клітину). Ні електронна мікроскопія, ні біохімічні дослідження не виявляють відмінностей між вірусними частками, які не викликають зараження і викликають зараження. Більшість вірусних часток, які не спричиняють зараження, містять повний вірусний геном. Ймовірно, більшість цих «не інфекційних» вірусних часток є потенційно цілком інфекційними. Ймовірно, невдача в повному здійсненні інфекційного процесу для більшості вірусних часток є справою випадку.

4.1.3. Бактеріофаги - прикріплення

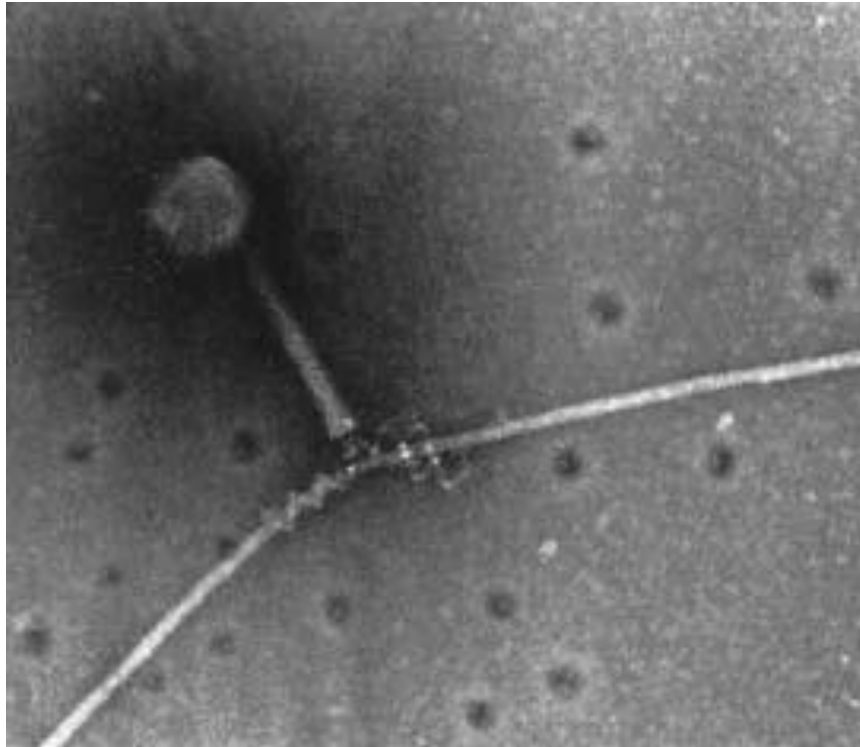
Аналогічно до вірусів тварин, бактеріофаги специфічно прикріплюються до молекул поверхні клітин бактерій, які грають роль рецепторів і корецепторів. Для багатьох фагів рецептори розташовуються на поверхні клітинної стінки хазяїна. Найкраще вивченими прикладами є прикріплення фагів T2 і T4. Віріони цих вірусів є складними структурами, що включають хвіст, базальну пластинку, шпильки і фібрили хвоста. Початкове прикріплення цих фагів до рецепторів на поверхні бактерій здійснюється дистальними кінцями довгих фібрил хвостового відростка (Мал. 4.7). Далі ці фібрили згинаються в центрі, частка фага наближається до клітинної стінки бактерії, і встановлюється контакт між клітинною стінкою і короткими шпильками на базальній пластинці фага.



Мал. 4.7. Етапи прикріплення бактеріофага Т4 до клітинної стінки бактерії (А-В) і електронна мікрофотографія *Escherichia coli* з фагами, що прикріпилися (Г).

Не усі фаги прикріплюються до клітинної стінки, деякі фаги можуть прикріплюватися до інших структур (пілі, джгутики або капсули). Наприклад, фаг χ прикріплюється до джгутика (мал. 4.8). Кінчик хвоста цього фага має вирости, які обгортаються навколо джгутика. Далі фаг ковзає по джгутику, поки не досягає клітини.

Деякі фаги прикріплюються до капсули, тоді як для інших сайтом з рецепторами клітини є пілі. При цьому нитчасті фаги, що містять одноланцюгову ДНК, прикріплюються до кінчика піля, а багато РНК-геномних сферичних фагів прикріплюються уздовж усього піля.



Мал. 4.8. Електронна мікрофотографія фага χ , що прикріпився до джгутика бактерії.

4.1.4. Вхід геномів бактеріофагів в клітини бактерій

4.1.4.1. Бактеріофаги, що мають голівку і хвіст

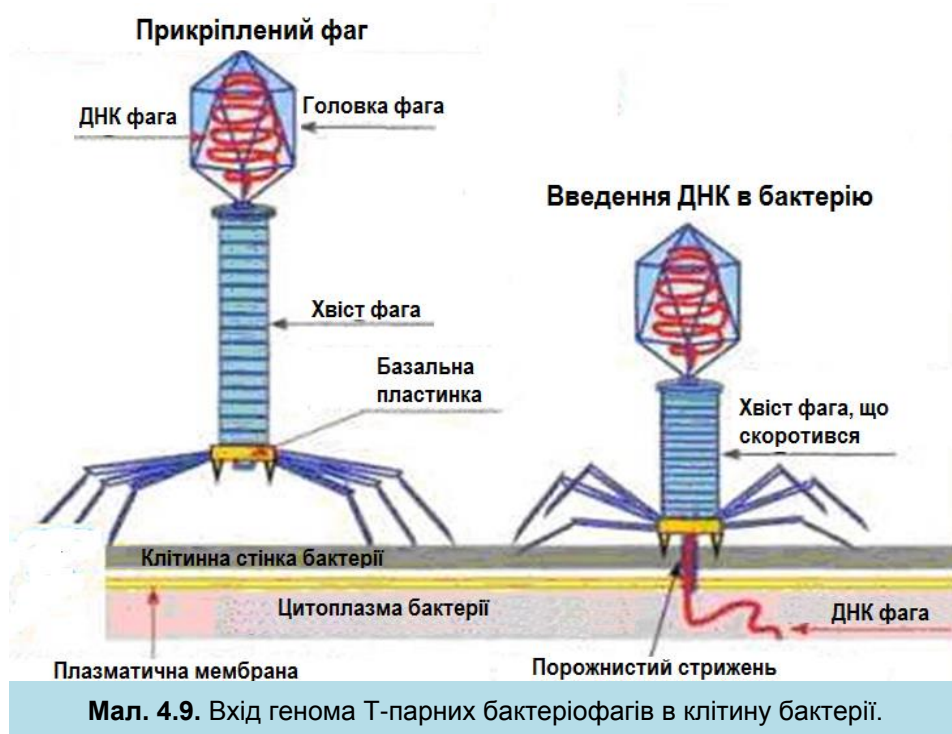
Хвостовий відросток деяких бактеріофагів, наприклад Т2 і Т4 (так звані «Т-парні» фаги), може скорочуватися. Він складається з 24 кілець, що оточують стержень. Ці кільця утворюють чохол навколо стержня. Кожне кільце складається з декількох великих і малих субодиниць.

Після прикріплення до поверхні бактерії, хвіст скорочується, завдяки об'єднанню великих і малих субодиниць, так що залишається тільки 12 кілець. Порожнистий стрижень у середині хвостового відростка не може скорочуватися, і він проходить через зовнішні шари бактерії хвилеподібними рухами. Цей процес, ймовірно, полегшується ферментом-лізозимом, який асоційований з хвостом фага. Далі стискання голівки призводить до уприскування ДНК фага в клітину бактерії. З чохлом фага пов'язані 144 молекули АТФ, і ймовірно їх гідроліз до АДФ забезпечує енергію для скорочення чохла хвостового відростка. Спосіб введення ДНК в клітину у фагів цього типу часто порівнюють з введенням ліків за допомогою шприца (мал. 4.9).

У бактеріофагів, які мають хвіст що не скорочується («Т-непарні» фаги Т1, Т3 та ін.), після прикріплення бактерії отвір для входу в клітину генома утворюється, ймовірно, за рахунок дії ферментів.

4.1.4.2. Інші бактеріофаги

Більшість бактеріофагів не мають скорочувального чохла, і спосіб, яким їх нуклеїнова кислота проникає в клітину, залишається невідомим. Для нитчастих ДНК-геномних бактеріофагів, які прикріплюються до пілю, передбачається, що ДНК і білок оболонки входять в клітину бактерії і постулюється, що після прикріплення фага комплекс фаг-пілю втягується в клітину бактерії. Проте для РНК-геномних фагів, які також прикріплюються до пілю, вхід білку оболонки в клітину показаний не був. Ці фаги у складі оболонки мають молекулу так званого А-білку, який упізнає рецептори на поверхні бактерії і служить для прикріплення. З'ясовано, що в клітину бактерії у випадку успішної інфекції потрапляють РНК фага і А-білок.



Мал. 4.9. Вхід генома Т-парних бактеріофагів в клітину бактерії.

4.1.5. Зараження рослин

Клітинна стінка, що оточує плазматичну мембрану рослинної клітини, запобігає прикріпленню і входу вірусів в клітину способами, аналогічними для вірусів тварин. Віруси здатні потрапити в цитоплазму рослинної клітини, тільки якщо рослинні тканини пошкоджені. З цієї причини рослини заражаються або за допомогою переносників, або через механічні ушкодження, викликані вітром або іншими причинами. Переносниками вірусів рослин можуть бути попелюхи, що живляться на рослинах, трипси, цикадки, кліщі, нематоди, фітопатогенні гриби. Круг рослин, що вражаються вірусом, зазвичай визначається видами рослин, на яких може житися переносник.

Потрапивши в клітину рослини, вірусна частка в цитоплазмі роздягається, завдяки зв'язуванню білків капсиду з білками цитоплазми рослинної клітини; на цей процес впливають також двовалентні катіони типу іонів кальцію. Вивільнений геном вірусу або цілі віріони переміщуються в рослині з клітини в клітину через плазмодесми, забезпечуючи поширення інфекції по рослині. Важливою особливістю фітопатогенних вірусів є кодування вірусами так званих *транспортних білків*, які сприяють переміщенню вірусних геномів в прилеглі

клітини. На значні відстані в рослині віруси поширюються по флоемі.

4.2. Транскрипція, трансляція і внутрішньоклітинний транспорт

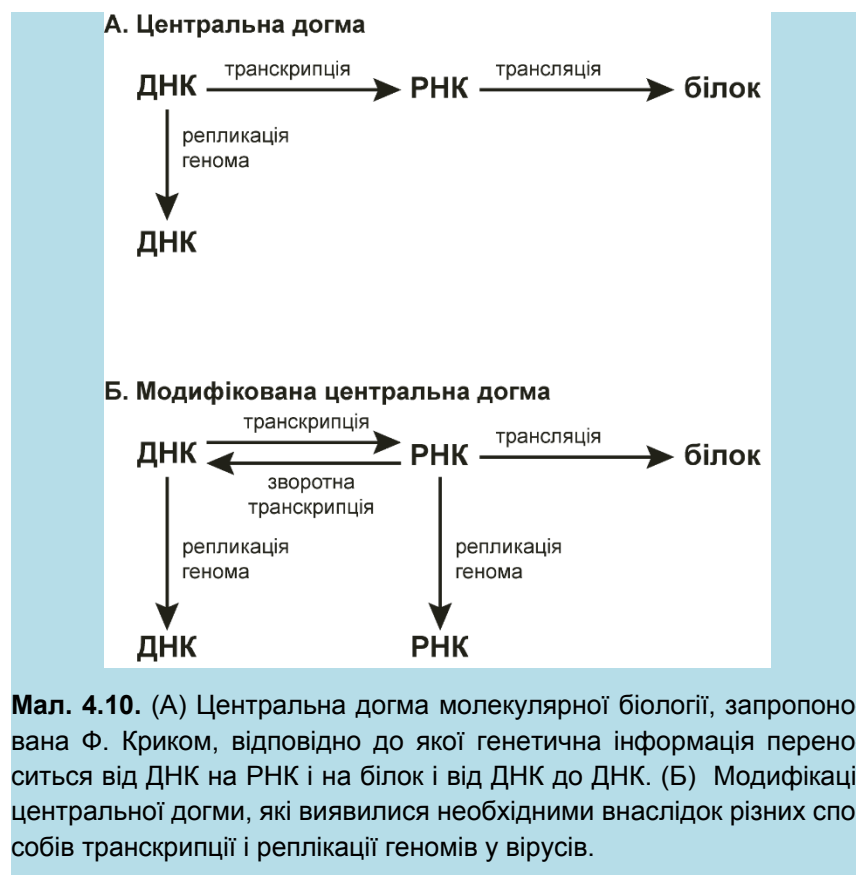
Після успішного зараження в клітині з'являються білки, що кодуються геномом вірусів. Інакше кажучи, починається експресія генів вірусів. Експресія генів — це процес, в ході якого спадкова інформація, представлена в геномі у вигляді послідовності нуклеотидів, перетворюється у функціональний продукт, — білок або РНК. У вірусів експресія генів відбувається за участю компонентів клітини-хазяїна і багато в чому схожа з процесами, які відбуваються в клітинах в нормальних умовах.

4.2.1. Центральна догма молекулярної біології і її модифікація

У 1958 році Френсіс Крик запропонував «центральну догму молекулярної біології», відповідно до якої для усіх без виключення живих організмів генетична інформація передається від ДНК до РНК і від РНК до молекули білку, а між поколіннями генетична інформація переноситься копіюванням ДНК (мал. 4.10А).

Проте поглиблене розуміння особливостей реплікації різних типів вірусів викликало внесення змін до центральної догми – виявилось, що багато вірусів мають в геномах РНК, яка копіюється на РНК, і у деяких вірусів генетична інформація переноситься з РНК на ДНК (мал. 4.10Б).

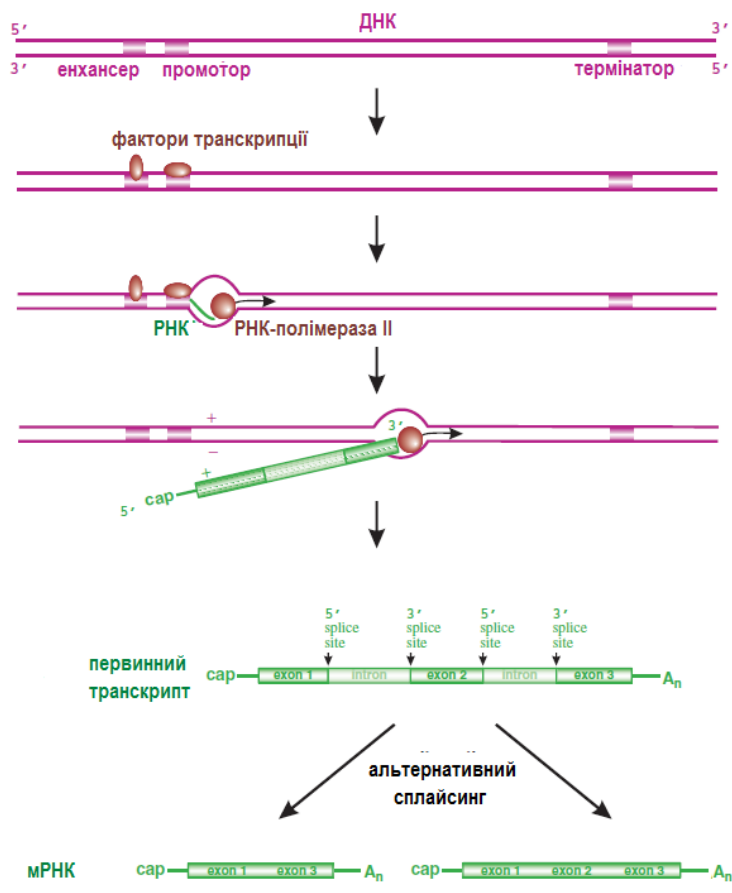
Експресія генів може регулюватися на всіх стадіях процесу: і під час транскрипції, і під час трансляції, і на стадії посттрансляційних модифікацій білків.



4.2.2. Транскрипція у еукаріот

Транскрипція генів багатьох вірусів протікає за участю механізмів, схожих з механізмами транскрипції генів у еукаріот; деякі з вірусів використовують з цією метою апарат транскрипції клітини. Експресія генів у еукаріот контролюється декількома специфічними

послідовностями нуклеотидів ДНК, до числа яких входять енхансери, промотори і термінатори. Схематично процес транскрипції показаний на мал. 4.11.



Мал. 4.11. Схематичне зображення процесу транскрипції. Обговорення див. в тексті.

Енхансери – послідовності, які містять ділянки зв'язування для факторів транскрипції, які впливають на інтенсивність транскрипції.

Промотори («вмикачі» транскрипції) – передуючі гену послідовності нуклеотидів, які розпізнає фермент РНК-полімераза. Основний елемент промотору – сайт зв'язування РНК-полімерази, яке вона займає перед початком синтезу РНК. До складу промоторів можуть входити також ділянки зв'язування білків-регуляторів.

Термінатори – послідовності, які примушують фермент припинити транскрипцію.

У промоторах багатьох генів еукаріот і вірусів є консенсусні послідовності⁴ нуклеотидів ТАТА(А/Т)А(А/Г). Ці послідовності відомі як ТАТА-бокси і зазвичай розташовані за 25–30 пар нуклеотидів від ділянки початку транскрипції.

Енхансери містять послідовності, які зв'язують фактори транскрипції, і ця взаємодія може інтенсифікувати процес транскрипції. Знаменно, що деякі енхансери можуть знаходитися на відстані до 1 млн. пар нуклеотидів перед промотором; таким чином, зближення енхансера з відповідним промотором досягається згортанням ДНК. Послідовності багатьох енхансерів специфічні для типу клітин.

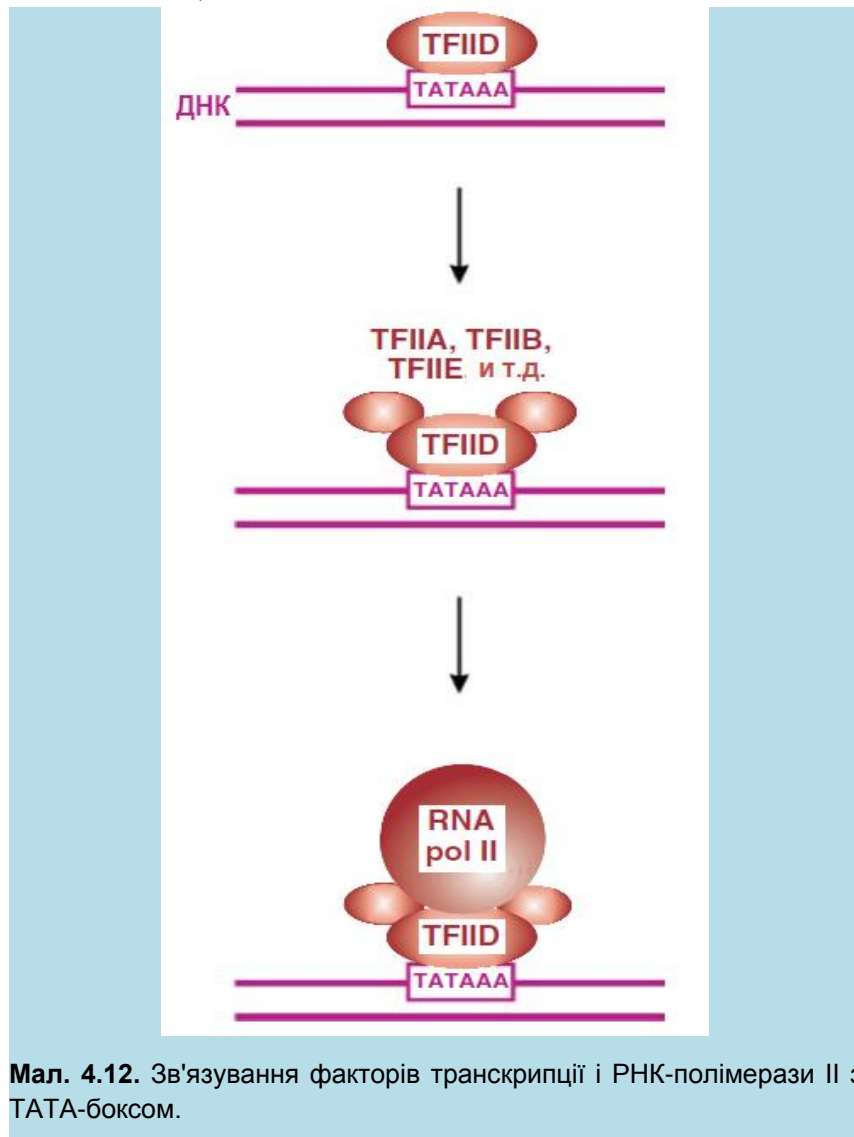
⁴ Консенсусна послідовність (consensus sequence) [лат. consensus – згода, однаковість] - усереднена послідовність нуклеотидів або амінокислот, що регулярно зустрічається (з невеликими варіаціями по окремих нуклеотидах або амінокислотах) в конкретному елементі (напр., в промоторі) у різних генів або у різних білків.

Фактори транскрипції є білками, які специфічно зв'язуються з послідовностями промоторів і енхансерів, контролюючи експресію гена. Деякі віруси кодують власні фактори транскрипції, наприклад у вірусу простого герпесу фактором транскрипції є білок VP16, що входить до складу віріона, а вірус Т-клітинної лейкемії людини 1 утворює фактор транскрипції Тах в заражених клітинах. Деяким вірусам потрібні клітинні тканиноспецифічні фактори транскрипції, що є однією з причин тканинної специфічності (тропізму) цих вірусів.

Деякі фактори транскрипції клітин, які називають загальними факторами транскрипції, беруть участь в контролі експресії генів у багатьох типів клітин. Прикладом такого фактора є IID (TFIID), який зв'язується з ТАТА-боксом. TFIID є комплексом, що складається з 13 поліпептидів, один з яких є білком, що зв'язує ТАТА-бокс. Після зв'язування TFIID з ТАТА-боксом, відбувається зв'язування інших факторів транскрипції (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF і TFIIH), а також РНК-полімерази II (мал. 4.12).

До клітинних факторів транскрипції, які зв'язуються з енхансерами, належать зокрема такі:

- AP-1 і AP-2 (activator proteins 1 and 2)
- Sp1 (stimulatory protein 1)
- NF-κB (nuclear factor κB).



Мал. 4.12. Зв'язування факторів транскрипції і РНК-полімерази II з ТАТА-боксом.

Фактори транскрипції можуть як активувати, так і пригнічувати експресію генів. Усі живі організми регулюють експресію своїх генів. Віруси також можуть перемикає різні

гени в циклі реплікації, на ранніх і пізніх його стадіях. Для деяких вірусів виділяють три (наприклад віруси герпесу) або навіть чотири (наприклад бакуловіруси) фази експресії генів.

4.2.2.1. Транскриптази

Транскрипція (синтез мРНК) здійснюється ферментами, які носять загальну назву транскриптази. Віруси, реплікація яких відбувається в ядрі, зазвичай використовують ферменти клітини-хазяїна, тоді як віруси, які реплікуються у цитоплазмі, кодують свої власні ферменти.

Для транскрипції ДНК-геномних вірусів потрібний фермент – ДНК-залежна РНК-полімераза. Такі віруси, транскрипція яких виконується в ядрі, в загальному випадку використовують РНК-полімеразу II клітини. Цей же фермент здійснює і транскрипцію у РНК-геномних ретровірусів, у яких транскрипція здійснюється на ДНК-копії геномної РНК. ДНК-геномні віруси, реплікація яких відбувається в цитоплазмі, кодують свою власну ДНК-залежну РНК-полімеразу, оскільки в цитоплазмі клітин немає відповідного ферменту.

Віруси, що містять РНК (за винятком ретровірусів) для транскрипції потребують РНК-залежної РНК-полімерази. Геноми рослин і деяких інших еукаріот містять гени РНК-залежної РНК-полімерази, проте віруси цей фермент для власних потреб використати не можуть. З цієї причини кожен вірус класів III, IV і V за системою Д. Балтімора кодує свою власну РНК-залежну РНК-полімеразу, яку використовує для транскрипції.

В усіх вірусів, у яких транскрипція відбувається в цитоплазмі, транскриптази входять до складу віріонів. Тому після зараження клітини фермент відразу ж може починати синтез мРНК. Інакше транскрипція цих вірусів не могла б відбуватися, оскільки клітина не має необхідного ферменту. Виняток становлять віруси, що мають геноми у вигляді (+)РНК (клас IV по Д. Балтімору). Геноми вірусів цього типу фактично є мРНК, і відразу ж після зараження клітини транслюються з синтезом необхідного білку, який надалі і здійснює транскрипцію.

4.2.2.2. Кепування і поліаденілювання

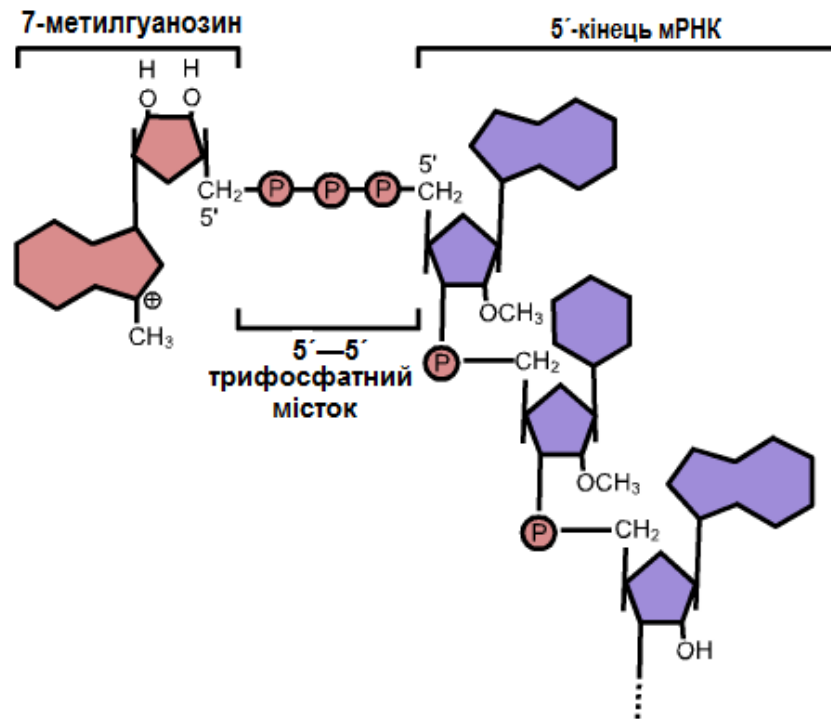
Незабаром після початку синтезу РНК, ще до завершення транскрипції, більшість транскриптів зазнають так зване кепування на 5'-кінці (мал. 4.11). Кеп є 7-метилгуанозинтрифосфатом, приєднаним до кінцевого нуклеотиду мРНК 5'–5' зв'язком (але не звичайним для зв'язування нуклеотидів 5'–3' зв'язком, мал. 4.13).

В певних випадках, окрім приєднання кепу, метильна група приєднується також до залишків рибози першого і другого нуклеотидів.

Більшість матричних РНК еукаріотичних клітин і вірусів, що заражають їх, мають кеп на 5'-кінці. Кеп, як вважають, виконує наступні функції:

- допомагає транспорту мРНК з ядра в цитоплазму;
- захищає мРНК від руйнування екзонуклеазами;
- потрібен для ініціації трансляції.

Ферменти клітини, які виконують кепування, є гуанілтрансферазами (приєднують гуанозинтрифосфат) і метилтрансферазами (приєднують метильну групу). У клітині ці ферменти локалізовані в ядрі, і більшість вірусів, транскрипція яких відбувається в ядрі, використовують клітинні ферменти.



Мал. 4.13. Кеп на 5'-кінці мРНК.

Багато вірусів, які реплікуються в цитоплазмі, кодують власні ферменти для кепування і метилювання своїх мРНК; до таких вірусів належать поксвіруси, реовіруси і коронавіруси. Проте віруси, що мають сегментовані геноми з мінус-ланцюгом РНК, виробили механізм «зриву шапок» з клітинних мРНК. До таких вірусів входять вірус грипу і вірус плямистого в'янення томатів. Комплекс білків вірусу, що становить РНК-полімеразу, зв'язується з кепованими мРНК клітини. Цей комплекс має ендонуклеазну активність, і клітинна мРНК розрізається на відстані 10-20 нуклеотидів від кепованого 5'-кінця. Кепований олігонуклеотид, що утворився, служить праймером для ініціації транскрипції вірусної РНК.

Не усе вірусні мРНК є кепованими. Наприклад, пікорнавіруси не кепують свої мРНК: ці віруси реплікуються в цитоплазмі, таким чином відсутня необхідність в транспорті мРНК з ядра, а трансляція у цих вірусів ініціюється незалежним від кепу механізмом (см далі).

Після завершення транскрипції, до 3'-кінця більшості первинних транскриптів еукаріот і їх вірусів додається ряд залишків аденозину, так званий поліаденіловий (полі(А)) хвіст. Поліаденілювання ймовірно збільшує стабільність мРНК, і полі(А) хвіст грає роль в ініціації трансляції. Ці функції, проте, можуть забезпечуватися іншими шляхами, оскільки низка вірусів, наприклад реовіруси, не поліаденілюють свої мРНК.

Сигнал поліаденілювання у більшості випадків розташований за 10-30 нуклеотидів до сайту поліаденілювання. Сигнал поліаденілювання ААТААА уперше був виявлений у вірусу приматів 40 (SV40) в 1981 році, і як далі було встановлено, його використовують як багато вірусів еукаріот, так і самі еукаріотичні клітини. Деякі віруси використовують інші послідовності, наприклад у гепаднавірусів ссавців сигналом поліаденілювання служить ТА-ТААА, послідовність, яка є ТАТА-боксом в іншому контексті!

У більшості випадків полі(А) хвіст додається таким чином. Впродовж транскрипції РНК-полімераза, переміщаючись по матриці, проходить через сигнал поліаденілювання і сайт поліаденілювання і досягає термінатора. Потім наново синтезована РНК розщеплюється в сайті поліаденілювання, і полі(А) хвіст додається крок за кроком комплексом білків, до якого входить полі(А)полімераза.

4.2.2.3. Сплайсинг транскриптів

Деякі первинні транскрипти є функціональними мРНК, проте більшість первинних транскриптів еукаріотичних клітин містять послідовності (інтрони), які вилучаються. Послідовності (екзони), що залишилися, з'єднуються в специфічних донорних і акцепторних сайтах, утворюючи мРНК (мал. 4.11). Первинний транскрипт може бути розрізаним і з'єднаним більш ніж одним способом, що призводить до формування двох або більше видів мРНК при транскрипції єдиного гена (альтернативний сплайсинг). Гени, які містять екзони та інтрони, називають «розщепленими генами».

Первинні транскрипти вірусів, реплікація яких відбувається в ядрі, так само можуть зазнавати сплайсинг при утворенні вірусних мРНК. Власне кажучи, перший доказ існування розщеплених генів був отриманий в 1977 році саме при вивченні вірусів. Альтернативний сплайсинг означає, що єдиний ген може кодувати більше за один вид білку. Це украй важливо для вірусів, оскільки збільшує інформаційну місткість генома без збільшення його розміру.

Існування розщеплених генів показане зокрема для аденовірусів, вірусів герпесу, парвовірусів і ретровірусів. У простому випадку розщеплений ген складається з двох екзонів, розділених одним інтроном. Проте часто структури вірусів генів значно складніші. Наприклад, ген *K15* асоційованого з саркомою Капоші вірусу герпесу має вісім екзонів і сім інтронів. Геном ВІЛ-1 має низку донорних і акцепторних сайтів сплайсингу; в результаті сплайсингу первинного транскрипту утворюється більше 30 різних мРНК.

4.2.3. Трансляція у еукаріот

Типова мРНК еукаріот є моноцистронною, тобто має одну так звану відкриту рамку зчитування (**open reading frame**, ORF)⁵, з якою відбувається трансляція (біосинтез) білку. Послідовності нуклеотидів вище і нижче ORF не транлюються (мал. 4.14). Деякі великі ORF кодують поліпротеїни, великі білки, які розщеплюються протеазами з утворенням двох або більше функціональних білків.

4.2.3.1. Ініціація трансляції

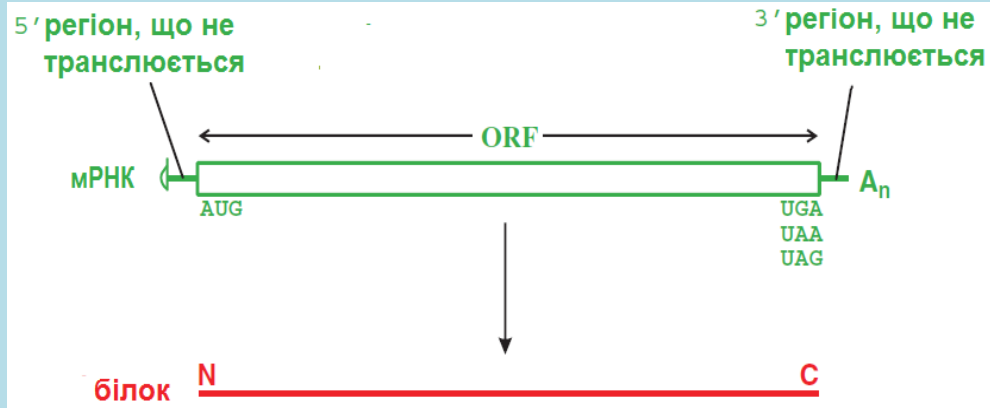
Як було відмічено раніше, більшість мРНК еукаріотичних клітин і їх вірусів мають метилований нуклеотидний кеп на 5'-кінці і полі(А) послідовність на 3'-кінці. Ці структури грають ключову роль в ініціації трансляції.

Особливо важливим є кеп; він є сайтом зв'язування для факторів ініціації еукаріот (**eukaryotic initiation factors**, eIFs) (мал. 4.15). Після зв'язування цих факторів, ініціаторна метионінова тРНК зв'язується зі своєю амінокислотою і 40S-субодиницею рибосоми. З полі(А) послідовністю на 3'-кінці мРНК зв'язуються специфічні для цієї послідовності білки. Білки, які зв'язуються з двома кінцями мРНК, здатні взаємодіяти один з одним, і вважається, що ця взаємодія приводить до замикання мРНК в кільце, що у свою чергу призводить до стимуляції трансляції. Матричні РНК, у яких відсутній кеп або полі(А) хвіст, повинні замикатися в кільце з використанням інших механізмів.

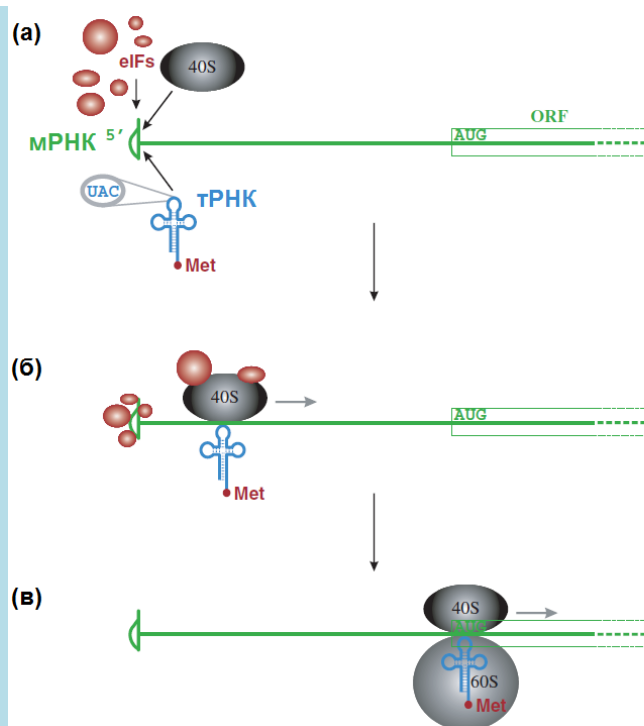
40S субодиниця рибосоми переміщується вздовж мРНК від 5'- до 3'-кінця, скануючи мРНК, поки не зустрінє перший ініціаторний (стартовий) кодон. Найчастіше це кодон AUG,

⁵ Відкрита рамка зчитування – послідовність нуклеотидів у складі ДНК або РНК, потенційно здатна кодувати білок. Основним параметром наявності ORF служить відсутність стоп-кодонів на досить тривалій ділянці послідовності після стартового кодону. Наявність ORF є необхідною, але не достатньою умовою для твердження про присутність на цій ділянці ДНК гена, що кодує поліпептид. Для ефективної транскрипції і трансляції потрібна, крім того, ціла низка регуляторних елементів, в першу чергу – промоторів і можливо енхансерів.

найближчий до 5'-кінця. Метионінова тРНК є ініціаторною, оскільки саме з її допомогою, за рахунок кодон-антикодонової взаємодії, скануючий комплекс знаходить стартовий AUG-кодон. Як тільки такий кодон знайдений, до малої субодиниці приєднується велика 60S субодиниця, тобто збирається ціла 80S рибосома, і починається синтез поліпептидного ланцюга.

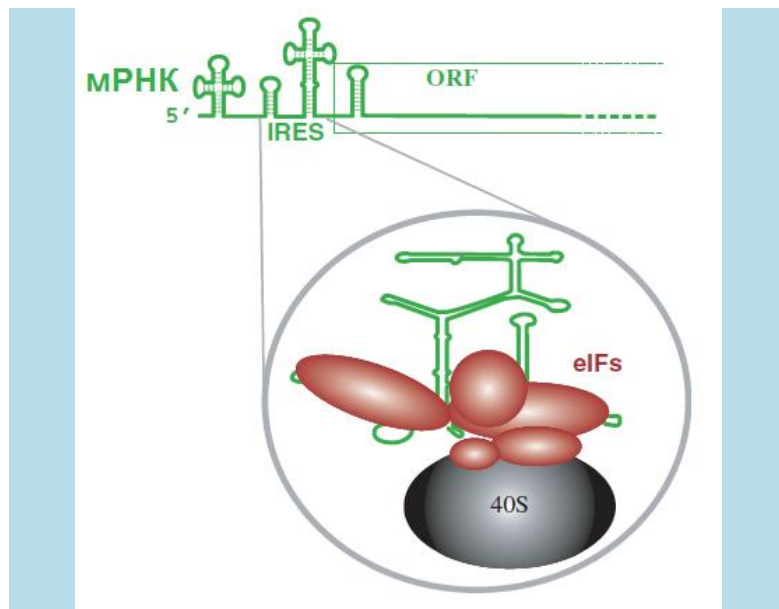


Мал. 4.14. Трансляція моноцистронної мРНК. Є одна відкрита рамка зчитування (ORF), яка зазвичай розпочинається з першого (стартового) кодону AUG на 5'-кінці мРНК і закінчується стоп-кодоном (UGA, UAA або UAG). Трансляція протікає у напрямі 5'→3', і N-кінець білку синтезується першим. Кеп зображений на 5'-кінці у вигляді кепі.



Мал. 4.15. Ініціація трансляції мРНК, яка має кеп. (а) Фактори ініціації еукаріот (eIFs), 40S субодиниця рибосоми і метіонін (Met), зв'язаний зі своєю тРНК, прикріплюються біля 5'-кінця мРНК. (б) Комплекс сканує мРНК у напрямку 3'-кінця. (в) Коли досягається перший кодон AUG, він розпізнається антикодоном UAC метионінової тРНК, прикріплюється 60S субодиниця рибосоми, а фактори ініціації вивільняються.

Деякі мРНК не мають кепа, і ініціація трансляції відбувається інакше. Скорочений набір eIFs зв'язується не з 5'-кінцем, а з так званим внутрішнім сайтом входження рибосоми (internal ribosome entry site, IRES), який має складну вторинну структуру (мал. 4.16). Внутрішні сайти входження рибосоми має низка РНК-геномних вірусів, таких як вірус гепатиту 3 і пікорнавіруси, а також одна з мРНК ДНК-геномного асоційованого з саркомою Капоші вірусу герпесу.



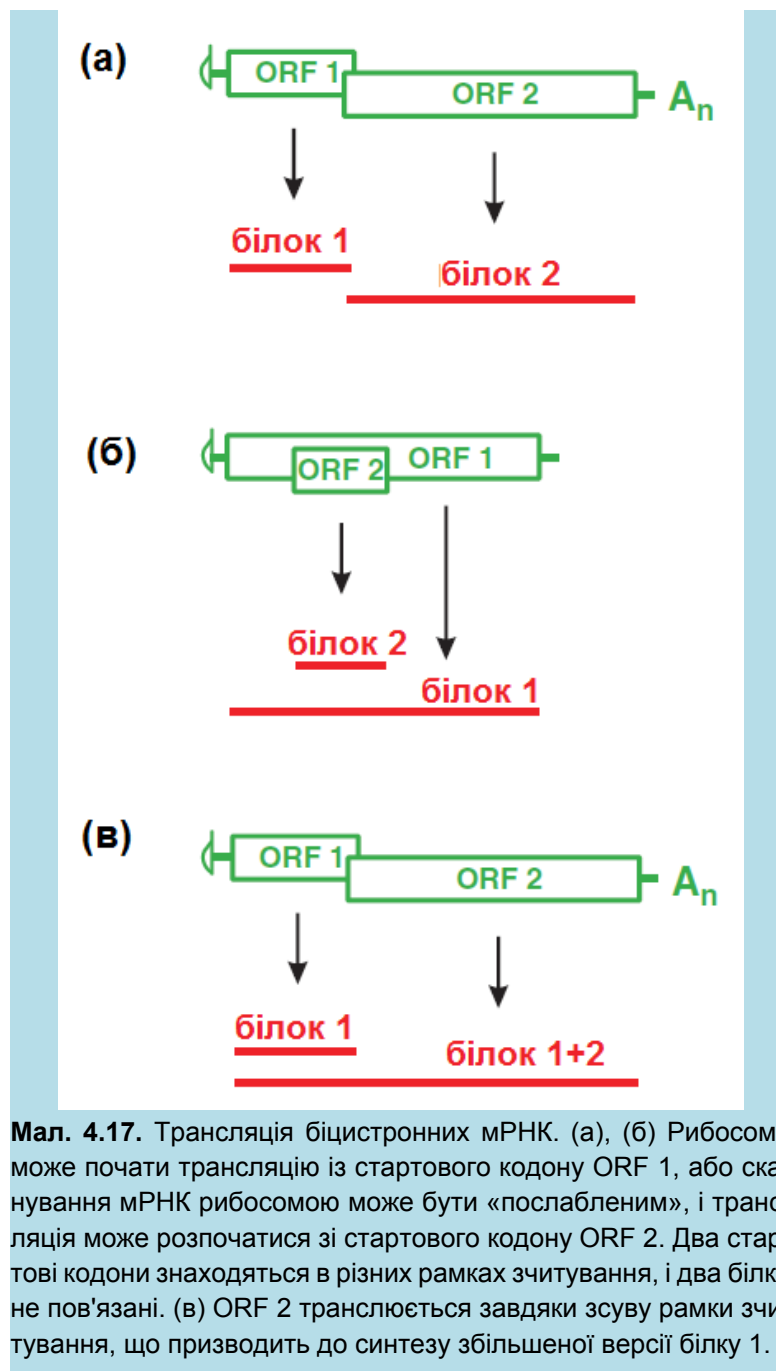
Мал. 4.16. Ініціація трансляції мРНК, яка не має кепа. 40S субодиниця рибосоми і eIFs зв'язуються з внутрішнім сайтом входження рибосоми (internal ribosome entry site, IRES), розташованим вище ORF.

4.2.3.2. Трансляція біцистронних мРНК

Більшість мРНК еукаріотичних клітин і вірусів мають одну відкриту рамку зчитування, але є вірусні мРНК, що мають дві або більше ORF. Відмінність в інтенсивності трансляції двох ORF забезпечує механізм експресії двох генів з різною інтенсивністю.

У багатьох біцистронних мРНК відкриті рамки зчитування перекриваються (мал. 4.17а); у інших випадках є одна ORF усередині іншої ORF (Малюнок 4.17б). Одним з механізмів читання другої рамки зчитування є «послаблене» сканування; 40S субодиниця рибосоми може пропустити стартовий кодон ORF 1 і ініціювати трансляцію із стартового кодону ORF 2.

Іншим механізмом читання другої ORF в мРНК є зсув рамки зчитування рибосоми (фреймшіфт); рибосома зміщується на іншу рамку зчитування у напрямку до кінця ORF 1. Завдяки цьому рибосома не розпізнає стоп-кодон ORF 1 і продовжує переміщатися по мРНК, прочитуючи ORF 2 (мал. 4.17в). Зсув рамки зчитування відбувається тоді, коли рибосома, переміщаючись уподовж мРНК, зустрічає сигнал фреймшіфту (специфічну послідовність), який супроводжується особливою вторинною структурою.



4.2.4. До- і посттрансляційні модифікації білків

Впродовж трансляції і після неї, білки можуть піддаватися одній або декільком модифікаціям, що включають глікозилювання, ацилювання і фосфорилування.

4.2.4.1. Глікозилювання

Глікозилювання включає приєднання до поліпептидного ланцюга олігоцукрових груп. Коли олігоцукри приєднуються через -ОН групу залишків серину або треоніну, процес називають О-глікозилюванням; коли олігосахариди приєднуються через -NH₂ групу залишку аспарагіну, то це називають N-глікозилюванням.

Білки, які мають бути глікозильовані, синтезуються на шорсткому ендоплазматичному ретикулумі, де починається N-глікозилювання. Далі вони транспортуються до комплексу Гольджі, де N-глікозилювання завершується. О-глікозилювання відбувається в комплексі Гольджі.

Деякі білки піддаються глікозилюванню тільки одного типу, наприклад N-глікозильований gp120 ВІЛ-1. Багато вірусних білок зазнають обидва типи глікозилювання, наприклад gC і gD вірусу простого герпесу.

Ці глікозильовані білки ВІЛ-1 і вірусу простого герпесу, як і більшість інших глікозильованих білків вірусів, є інтегральними мембранними білками, компонентами оболонки віріонів. Проте деякі глікозильовані білки не пов'язані з оболонкою віріона; віріони ротавірусів не мають оболонки, але їх білок поверхні VP7 є глікозильованим. Деякі глікозильовані білки вірусів є неструктурними, наприклад білок ротавірусів NSP4.

4.2.4.2. Ацилювання

Ацилювання – це додавання ацильної групи ($R-CO-$) до молекули білку. Ацильною групою, що зазвичай додається до білку, є являється міристильна група, де R є $CH_3-(CH_2)_{12}$. Міристильна група приєднується до залишку гліцину на N-кінці білку. Більшість вірусів не кодує білок N-міристилтрансферазу, таким чином процес приєднання цієї групи до білків вірусу виконується ферментами хазяїна.

Багато білок вірусів з міристильними групами пов'язані з мембранами, наприклад білки Gag ретровірусів. Якщо ці білки не стануть міристильованими, вони не можуть асоціюватися з плазматичною мембраною і збирання віріонів не може відбутися.

4.2.4.3. Фосфорилування

Фосфорилування означає перенесення фосфатної групи з нуклеотиду, зазвичай АТФ, на кисень $-OH$ групи залишків серину, треоніну або тирозину. Перенесення виконується протеїнкіназами, які можуть бути ферментами хазяїна або кодуватися вірусом.

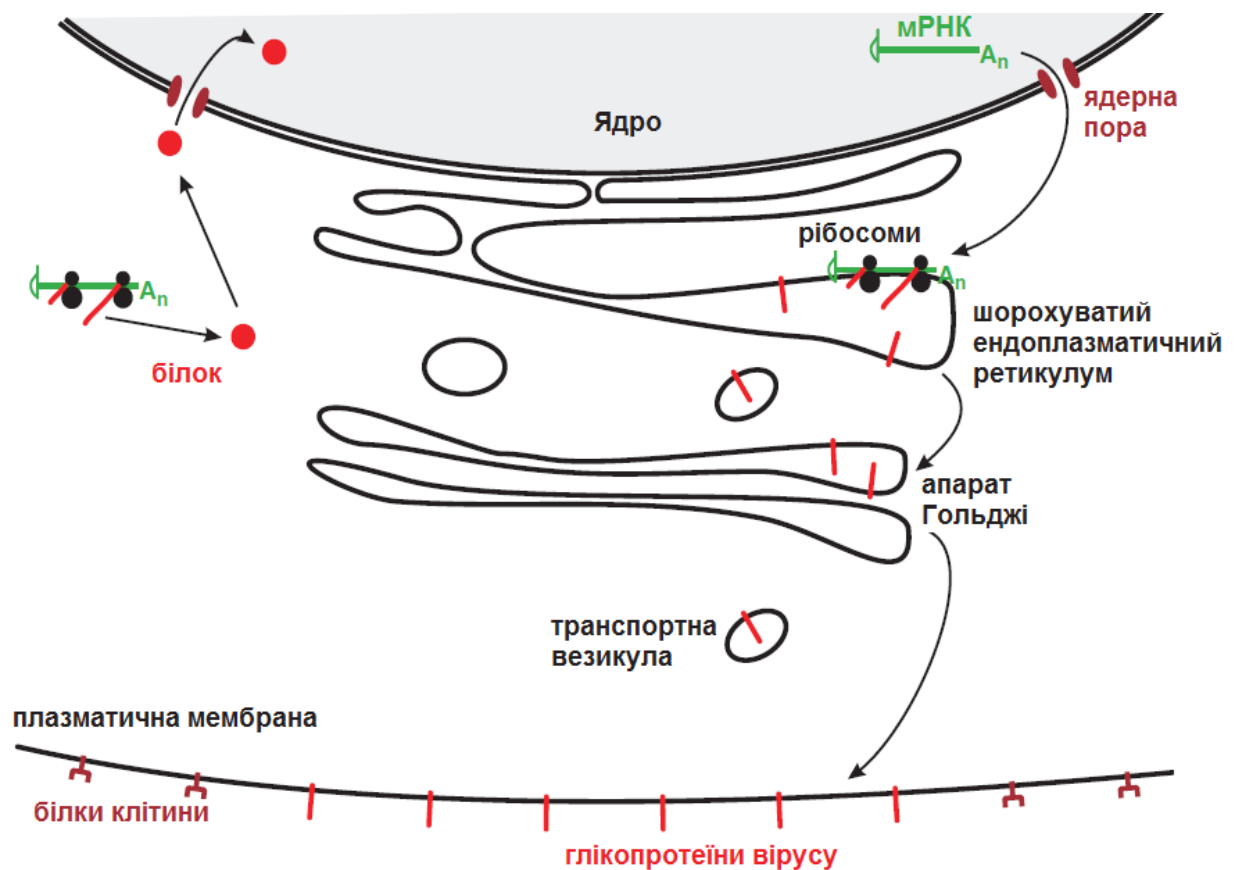
Фосфорилування змінює конформацію, активність, локалізацію і/або стабільність білку, і багато процесів в клітині, у тому числі і при реплікації вірусів, включають фосфорилування білків. Багато структурних і неструктурних білок вірусів стають фосфорильованими, наприклад фосфопротейни рабдовірусів.

4.2.5. Транспорт усередині клітин еукаріот

Вище, в розділі 4.1.2.3, обговорювалося питання, як нуклеокапсиди і інші вірусні структури транспортуються по мікротрубочках до ядерних пір після входу вірусу в клітину. Проте переміщатися усередині клітини до певних ділянок повинні не лише нуклеокапсиди, але і молекули вірусів, які синтезуються в процесі реплікації. Вірусні мРНК транспортуються з ядра в цитоплазму, і вірусні білки повинні транспортуватися в певні місця розташування, включаючи ядро (мал. 4.18).

Багато білків мають послідовності амінокислот (сигнальні послідовності), які визначають їх місце розташування. Білки, які мають бути включеними в мембрани, мають сигнальну послідовність, представлену серією гідрофобних амінокислотних залишків, або на N-кінці, або усередині білку. Синтез білків починається на вільній рибосомі, але коли синтезується сигнальна послідовність, вона направляє комплекс поліпептид-рибосома до ендоплазматичного ретикулуму, де синтез білку триває. Ділянку ендоплазматичного ретикулума, що асоціюється з рибосомами, називають шорстким ендоплазматичним ретикулумом.

Кожен інтегральний мембранний білок має одну або більше послідовностей, збагачених гідрофобними амінокислотними залишками. Багато білків, синтезованих на шорсткому ендоплазматичному ретикулумі, далі транспортуються за участю везикул до апарату Гольджі, і більшість інтегральних мембранних білків глікозилюються в цьому компартменті. З комплексу Гольджі глікопротеїни транспортуються до інших мембран, таких як плазматична мембрана або ядерна оболонка. Дочірні віріони можуть брунькуватися через ці мембрани.



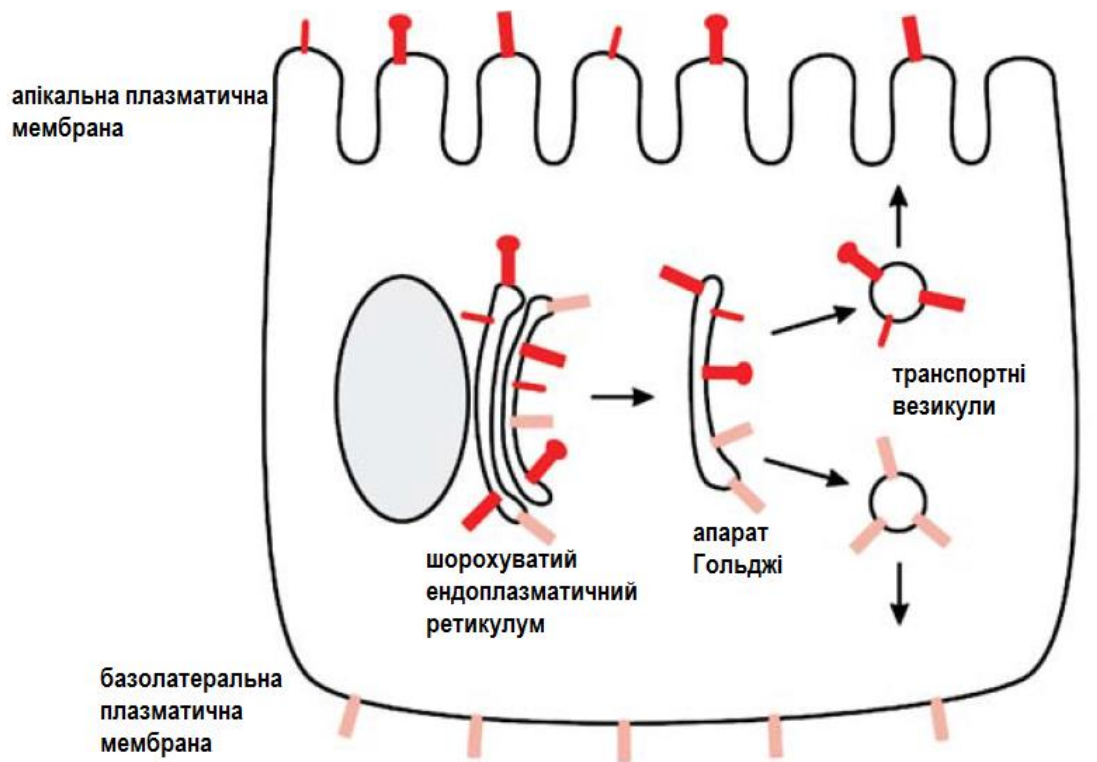
Мал. 4.18. Синтез і внутрішньоклітинний транспорт молекул. Деякі білки, які трансклюються на вільних рибосомах, транспортуються через ядерні пори в ядро. Інші білки, які трансклюються на шорсткому ендоплазматичному ретикулумі, транспортуються через апарат Гольджі до плазматичної мембрани.

Епітеліальні клітини мають апікальну (зовнішню) і базолатеральну (внутрішню) поверхні, які складаються з ліпідів і білків, що розрізняються, і відокремлені щільними контактами. При зараженні епітеліальних клітин вірусами, що мають оболонку, брунькування віріонів може обмежуватися або апікальною поверхнею, або базолатеральною поверхнею.

Енріке Родрігес-Боулан і Девид Сабатіні виявили в 1978 році, що вірус везикулярного стоматиту брунькується скрізь базолатеральну поверхню, а вірус грипу брунькується скрізь апікальну поверхню. Це ймовірно пояснює, чому більшість вірусних інфекцій у ссавців локалізована в дихальних шляхах. Вони показали, що глікопротеїни кожного вірусу спрямовуються до відповідної поверхні клітини (мал. 4.19). Кожен білок має сигнальну послідовність, яка визначає, до якої мембрани клітини він переміщається у складі транспортних везикул.

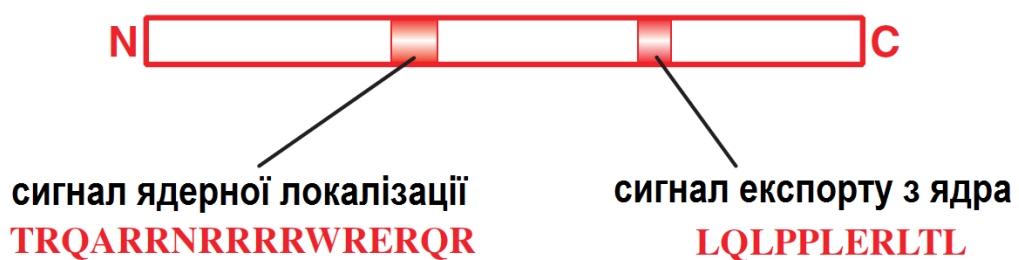
Якщо віруси реплікуються в ядрі, то більшість, якщо не усі, білків вірусу мають бути спрямовані в ядро. Ці білки, як і власні білки клітини, які переміщаються в ядро, мають так званий сигнал ядерної локалізації. Цей сигнал становить специфічну послідовність, збагачену однією або двома основними амінокислотами лізином і аргініном.

Сигнал ядерної локалізації уперше був виявлений у білку вірусу приматів 40. Цей сигнал дозволяє білку зв'язуватися з білками клітини, імпортинами, і далі з філаментами ядерної пори, через яку білок і транспортується в ядро.



Мал. 4.19. Направлення вірусних білків до апікальної і базолатеральної поверхонь епітеліальних клітин. Білки вірусу грипу А (червоного кольору) і вірусу везикулярного стоматиту (рожевого кольору) транспортуються до апікальної і базолатеральної поверхонь відповідно.

РНК також транспортуються усередині клітини, наприклад мРНК після синтезу в ядрі повинні експортуватися через ядерну пору в цитоплазму. РНК доставляється в потрібні місця білками, які з нею зв'язуються. Білок Rev ВІЛ-1 має як сигнал ядерної локалізації, так і сигнал експорту з ядра (мал. 4.20). Завдяки сигналу ядерної локалізації, Rev транспортується в ядро, де специфічно зв'язується з РНК вірусу. Завдяки сигналу експорту з ядра, Rev і пов'язана з ним РНК транспортуються через ядерну пору в цитоплазму.

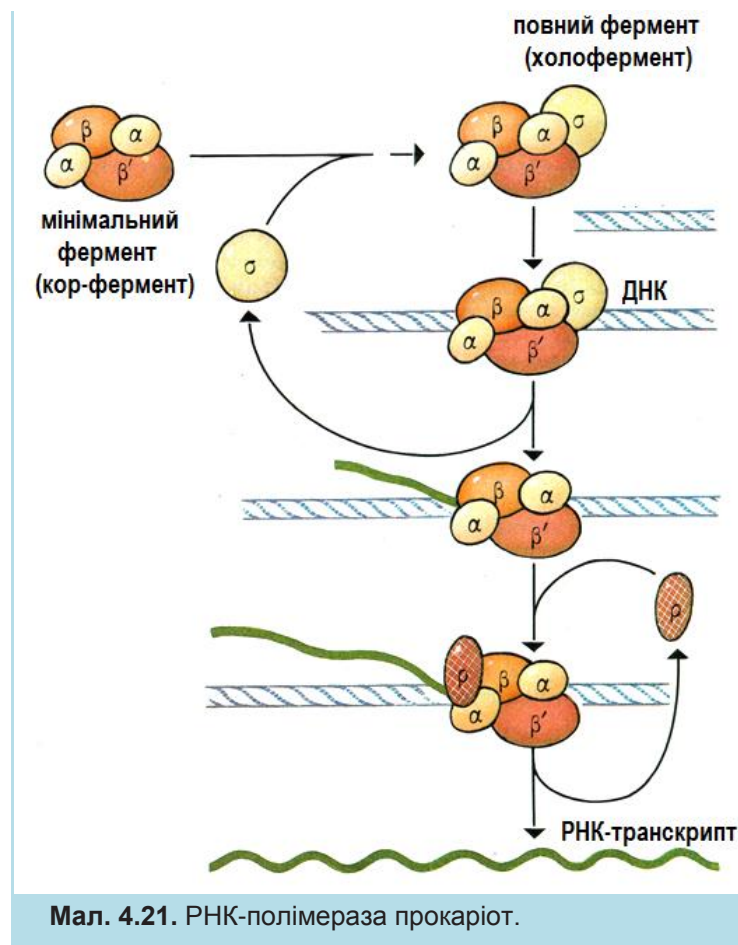


Мал. 4.20. Білок Rev ВІЛ-1. Сигнал ядерної локалізації збагачений залишками аргініну (R). Сигнал експорту з ядра збагачений залишками лейцину (L).

4.2.6. Транскрипція і трансляція в клітинах бактерій

У прокаріот є єдиний тип ДНК-залежної РНК-полімерази. Фермент *E. coli* складається з каталітичного кор-ферменту (мал. 4.21), який містить одну субодиницю β , одну субодиницю β' і дві субодиниці α , а також регуляторного білку, сигма-фактора (σ). Сигма-фактор визначає специфічність до промоторів і дозволяє полімеразі розпізнавати і зв'язуватися зі специфічними промоторами в вірній орієнтації для ініціації транскрипції. Бактерійні промотори мають характерні послідовності: -10 регіон (Прибнов-бокс) і -35 регіон, які знаходяться на 10 і 35 пар нуклеотидів лівіше (вище) за початок транскрипції. Ці послідовності

розпізнають сигма-фактори. Після ініціації транскрипції, сигма-фактор від'єднується і може бути використаний повторно.



Різні сигма-фактори розпізнають різні промотори. Транскрипція завершується після транскрипції термінатора. Завершення транскрипції може бути ро-незалежним (внутрішнім) і ро-залежним. Ро-незалежна термінація опосередкована послідовністю ДНК-матриці, яка включає інвертований повтор і декілька залишків аденіну. Ця послідовність розташована правіше за ро-незалежні гени. Після синтезу ланцюга комплементарної РНК, в цій ділянці тільки що синтезована молекула формує стебло-петлю, за якою розташовано декілька урацилів. Зв'язки між аденінами ДНК і урацилами РНК призводять до утворення гібридної РНК-ДНК, і транскрипт РНК від'єднується від матриці.

Ро-залежна термінація включає так званий ро-фактор (rho factor), який має геліказну і АТФ-азну активності, завдяки яким він розкручує гібрид РНК-ДНК, коли полімераза досягає інвертованого повтору. Це призводить до вивільнення транскрипту.

Клітини бактерій і віруси, що вражають їх, використовують механізми транскрипції і трансляції, які по ряду аспектів відрізняються від механізмів, використовуваних еукаріотами. У геномах бактерій і вірусів бактерій рідко зустрічаються інтрони. Деякі фаги для своєї транскрипції використовують ДНК-залежні ДНК-полімерази хазяїна, тоді як інші кодують свої власні. мРНК еукаріот в типовому випадку моноцистронні, а у бактерій – поліцистронні, тобто кожна мРНК має декілька відкритих рамок зчитування (мал. 4.22). мРНК бактерій і їх вірусів ніколи не бувають кепованими на 5'-кінці і рідко мають полі(А) хвіст на 3'-кінці.

Трансляція у бактерій відрізняється від трансляції у еукаріот низкою особливостей.

- Трансляція може починатися до того, як завершиться транскрипція: відсутність ядра

дозволяє одночасному перебігу транскрипції і трансляції.

- Рибосоми прокаріот менше, ніж у еукаріот (субодиниці рибосом мають коефіцієнти седиментації 30S і 50S).

- Субодиниця 30S рибосом зв'язується безпосередньо з регіоном ініціації трансляції на мРНК. Ініціація зазвичай включає взаємодію між послідовністю Шайна-Дальгарно (Shine-Dalgarno sequence, S - D) на мРНК і комплементарною анти-S-D послідовністю на 3'-кінці молекули 16S рРНК 30S субодиниць. Регіон ініціації трансляції знаходиться безпосередньо перед стартовим кодоном AUG. Послідовність S -D складається з шести нуклеотидів AGGAGG; у випадку *E. coli* послідовність Шайна-Дальгарно є AGGAGGU. Послідовність анти-S- D на рибосомній 16S РНК містить CCUCCU.

- Метіонін в ініціаторній метионіл-тРНК зазвичай є формілованим (містить групу – CHO).

- У ініціації трансляції бере участь значно менше факторів ініціації в порівнянні з еукаріотами.

- Транслюються усі ORF в межах мРНК. Декілька фагів містять гени, що перекриваються, і їх трансляція відбувається за допомогою читання через стоп-кодон або фреймшифтингу (розділ 4.2.3.2).



Мал. 4.22. У типовому випадку мРНК бактерій, як і мРНК бактеріофагів, має декілька відкритих рамок зчитування, які можуть транслюватися одночасно. 5'-кінець не має кепа, 3'-кінець має полі(А) в окремих випадках.

4.3. Реплікація вірусної нуклеїнової кислоти

Реплікація генома вірусу, що заразив клітину, забезпечує додаткові копії нуклеїнової кислоти для підвищення інтенсивності транскрипції і забезпечує копіями геномів дочірні віріони.

Найчастіше ДНК-геномні віруси копіюють свої геноми безпосередньо в ДНК, а РНК-геномні віруси – в РНК. Проте деякі ДНК-геномні віруси синтезують геноми через проміжну РНК-форму, а деякі РНК-геномні віруси – через проміжну ДНК-форму.

Якщо говорити про внутрішньоклітинну локалізацію реплікації нуклеїнової кислоти вірусів, то вона залежить від типу генома. Геноми більшості ДНК-вірусів реплікуються в ядрі, хоча деякі віруси, що містять дволанцюгову ДНК, реплікуються в цитоплазмі. Геноми більшості РНК-вірусів реплікуються в цитоплазмі, проте віруси, геноми яких представлені сегментованою (–)РНК, реплікуються в ядрі. Особливі випадки становлять ретровіруси і параретровіруси, у яких стадія реплікації РНК в ДНК (зворотна транскрипція) здійснюється в цитоплазмі, а реплікація ДНК в РНК – в ядрі.

Ключовими ферментами, які виконують реплікацію вірусних геномів, є ДНК-полімерази і РНК-полімерази. Багато вірусів кодують свої власні полімерази, тоді як деякі віруси використовують ферменти клітини.

Віруси, що містять в геномах ДНК, потребують ДНК-залежної ДНК-полімерази. Серед ДНК-геномних вірусів, у яких реплікація генома здійснюється в ядрі клітини, віруси з невеликими геномами (наприклад папіломавіруси) використовують фермент хазяїна, тоді як

віруси з великими геномами (наприклад віруси герпесу) кодують свої власні ферменти. ДНК-геномні віруси, у яких реплікація генома відбувається в цитоплазмі, завжди кодують свої власні ферменти, оскільки відповідних ферментів клітини в цитоплазмі немає.

У вірусів, що мають в геномах РНК, реплікація генома здійснюється РНК-залежною РНК-полімеразою. Хоча такі ферменти містять рослини і деякі інші еукаріоти, віруси використовують виключно кодовані ними ферменти. У багатьох вірусів ця РНК-залежна РНК-полімераза є тим самим ферментом, який використовується і для транскрипції (розділ 4.2.2.1).

Ретровіруси і параретровіруси кодують фермент зворотну транскриптазу, який здійснює транскрипцію РНК в ДНК, і використовують РНК-полімеразу II клітини-хазяїна для транскрипції ДНК в РНК.

4.3.1. Реплікація геномів ДНК-геномних вірусів (класи 1 і 2 за системою Д. Балтімора)

Віруси, геном яких представлений ДНК, заражають тварин, рослин і бактерій. Геномна ДНК може бути одно- або дволанцюговою, лінійною або замкнутою в кільце. Основний механізм, за допомогою якого в клітині синтезується новий ланцюг ДНК, є тим самим, незалежно від того, реплікується ДНК самої клітини або вірусу. Проте віруси використовують цей основний механізм різними способами, відповідно до специфіки структури свого генома.

4.3.1.1. Загальний механізм реплікації ДНК

В ході успішної реплікації дволанцюгової ДНК синтезуються два дочірні ланцюги. Процес синтезу нових ланцюгів повинен починатися на якійсь ділянці. Ділянка молекули матриці, на якій починається синтез, є специфічною і називається точкою початку реплікації. Для того, щоб реплікація почалася, з цією точкою повинні зв'язатися специфічні білки, і два ланцюги ДНК мають бути відокремлені один від одного, щоб правити за матриці для синтезу. Точка початку реплікації має специфічну послідовність нуклеотидів, яка є симетричною в кожному ланцюзі і збагачена АТ-парами.

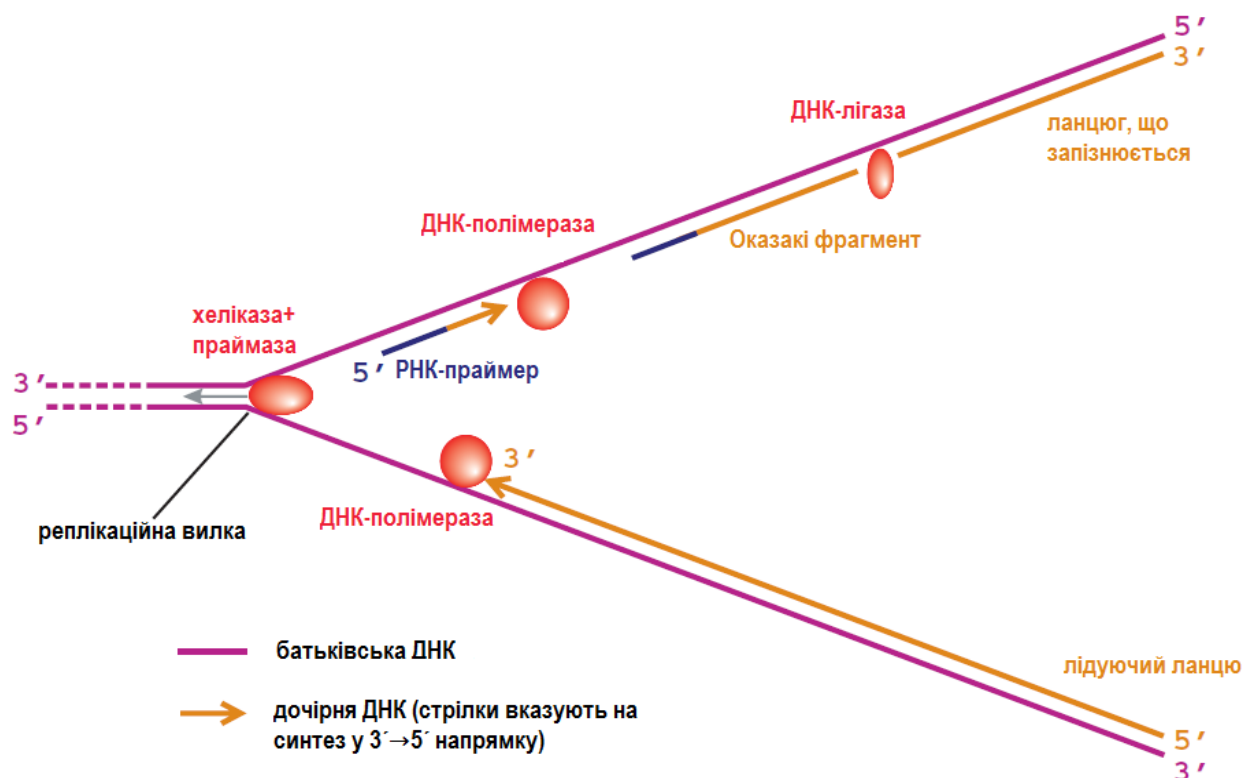
Оскільки батьківські ланцюги антипаралельні, дочірні ланцюги також мають бути антипаралельними. Якщо ДНК-полімераза просто переміщатиметься уздовж дволанцюгової батьківської молекули ДНК, то один дочірній ланцюг має бути синтезований у напрямі $5' \rightarrow 3'$, а інший у напрямі $3' \rightarrow 5'$. Проте усі відомі на сьогодні ДНК-полімерази не здатні проводити синтез ДНК у напрямі $3' \rightarrow 5'$. Більше того, і біохімія процесу синтезу ДНК переконує, що такий синтез неможливий.

Одним з вирішень цієї проблеми є та, що синтез дочірнього ланцюга у напрямі $5' \rightarrow 3'$ відбувається безперервно на одному батьківському ланцюзі, що називається **лідуючим ланцюгом**. В той же час на протилежному ланцюзі, що називається **ланцюгом, що запізнюється**, синтез ДНК відбувається також у напрямі $5' \rightarrow 3'$, але переривчасто. По суті, коли комплекс ферментів рухається уздовж лідуючого матричного ланцюга, збільшується довжина одоланцюгової ділянки ланцюга, що запізнюється. Як тільки вона досягає достатньої довжини, ініціюється синтез фрагмента дочірнього ланцюга, поки полімераза не досягне $5'$ -кінця раніше синтезованого фрагмента. Такі фрагменти були названі фрагментами Оказаки на честь японського ученого Рейджи Оказаки, який показав їх наявність при вивченні реплікації ДНК бактеріофага у бактерії *Escherichia coli* в 1968 році. Таке рішення проблеми односпрямованого синтезу ланцюга ДНК використовують усі живі організми. Його використовує також низка вірусів (мал. 4.23).

Альтернативним рішенням проблеми односпрямованого синтезу, яке використовують

деякі віруси, є розділення в часі синтезу дочірніх ланцюгів ДНК: кожен з ланцюгів синтезується окремо. Прикладом вірусів, що використовують такий механізм реплікації, є аденовіруси. Однією з причин, чому такий механізм не використовується ширше, є та, що синтез одного ланцюга неминуче затримується стосовно синтезу іншого ланцюга, і отже в проміжний період після першої реплікації фермент повинен пройти через подвійний ланцюг одного ланцюга матриці і скопійованого першого ланцюга, таким чином відкривається значна доля одноланцюгової ДНК (другий ланцюг матриці). Одноланцюгова ДНК схильна до рекомбінацій, тому платою за подібний механізм реплікації буде генетична нестабільність, яка неприйнятна для організмів з великим геномом.

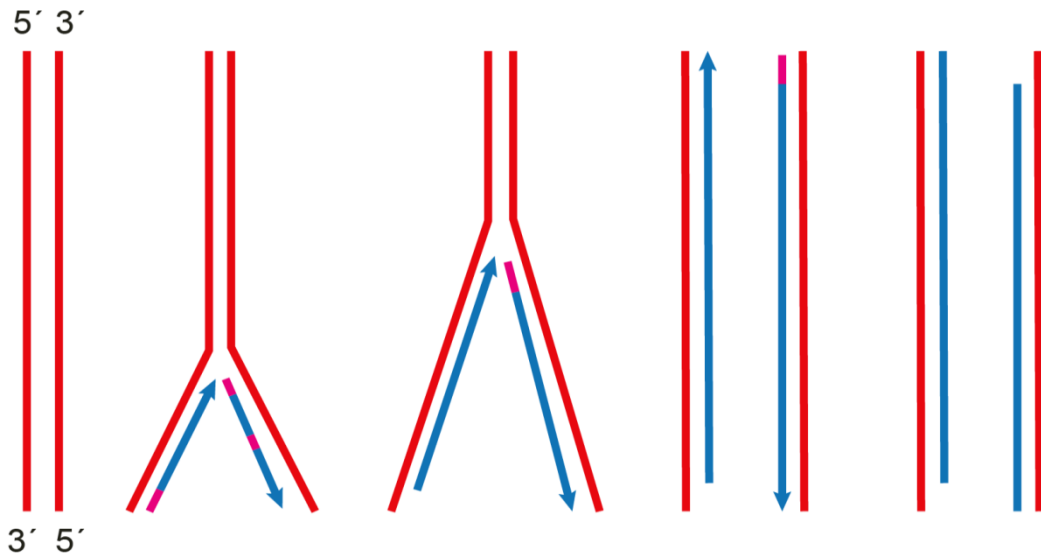
Протягом реплікації, синтез нового ланцюга ДНК повинен ініціюватися, принаймні, на початку процесу. Це призводить до виникнення нової проблеми, оскільки ДНК-полімерази не здатні починати синтез ДНК *de novo*, вони вимагають гідроксильної групи, праймера, з якої синтез буде тривати. Загальним рішенням цієї проблеми є використання особливої ДНК-залежної РНК-полімерази, оскільки вона не вимагає праймера для початку синтезу. Цей фермент (праймаза) синтезує на ДНК-матриці короткий РНК-праймер, який надалі використовується ДНК-полімеразою для продовження синтезу. Після використання праймера, він видаляється специфічним ферментом, який розпізнає і руйнує РНК, спарену з ДНК. Проміжок надалі заповнюється знову синтезованою ДНК, і фрагменти з'єднуються ДНК-лігазою (мал. 4.23).



Мал. 4.23. Схематичне зображення реплікації ДНК. Комплекс хеліказа+праймаза розкручує дволанцюгову батьківську ДНК і синтезує РНК-праймери, які використовуються ДНК-полімеразою для ініціації синтезу ДНК. Лідуючий ланцюг синтезується безперервно, ланцюг, що запізнюється, синтезується у вигляді фрагментів Оказаки, які з'єднуються разом ДНК-лігазою.

Необхідність у праймері для синтезу ДНК створює труднощі в забезпеченні реплікації лінійних молекул. Коли синтез у напрямі $5' \rightarrow 3'$ ініціюється РНК-праймером, який далі

видаляється, то немає механізму для заповнення проміжку на 5'-кінці лідируючого ланцюга. У кінці циклу реплікації така ж проблема виникає у ланцюга, що запізнюється. Без вирішення цієї проблеми, результатом реплікації будуть одноланцюгові хвости на 3' кінцях батьківських ланцюгів і дочірні ланцюги неповної довжини (мал. 4.24). Зрештою, при кожному циклі реплікації ДНК коротшатиме.



Мал. 4.24. Укорочення дочірніх ланцюгів ДНК на 5'-концах при реплікації лінійних молекул ДНК. Червоним кольором показані батьківські ланцюги ДНК, синім – дочірні ланцюги ДНК, рожевим – РНК-праймери.

Проблема «реплікації кінців» є загальною у біології. У еукаріотів вона вирішується за допомогою використання теломер на кінцях кожної лінійної хромосоми. Теломери складаються з численних повторів нуклеотидів, пов'язаних зі спеціальними білками. Існує спеціальний фермент — теломераза, який за допомогою власної РНК-матриці добудовує теломерні повтори і подовжує теломери в кожному циклі ділення. Таким чином, довжина хромосом зберігається від одного ділення до іншого. У людини у більшості диференційованих клітин теломераза не експресується, проте активна в стовбурових і статевих клітинах.

Прокаріоти, на відміну від еукаріот, вирішують цю проблему шляхом використання геномів, замкнутих в кільце. Низка вірусів також використовує подібний підхід, проте інші використовують унікальні механізми вирішення проблеми реплікації кінців.

4.3.1.2. Реплікація геномів вірусів, які представлені кільцевою дволанцюговою ДНК

Одним з найбільш вивчених вірусів є мавпячий вірус 40 (Simian virus 40, SV40). Він був так названий, оскільки виявився 40-м вірусом, виділеним з приматів. Його геном є кільцевою дволанцюговою ДНК завдовжки 5243 пар нуклеотидів.

Кільцевий геном має єдину точку початку реплікації (мал. 4.25), з якою починається координований синтез обох ланцюгів з використанням РНК-праймерів. Далі утворюються дві реплікаційні вилки, які рухаються в протилежних напрямках. У міру просування реплікаційних вилок формується структура, яка нагадує грецьку букву «тета» і яку називають проміжною тета-формою.

Зрештою, реплікаційні вилки зустрічаються на протилежній відносно точки початку реплікації стороні геномної ДНК, завершивши повне копіювання обох ланцюгів. Спочатку нові геноми є топологічно пов'язаними, що є неминучим при реплікації кільцевої молекули, і на завершальному етапі реплікації відбувається їх розчеплення.

Для реалізації процесу реплікації геномної ДНК вірусу SV40 потрібні 10 білків. Тільки один білок кодується вірусом, інші дев'ять належать клітині хазяїна. Заслугує особливої

згадки та обставина, що клітинні білки при реплікації вірусної ДНК виконують таку ж функцію, яку вони виконують і при реплікації власної ДНК клітини.

Вірусний білок, великий Т-антиген, виконує багато функцій, необхідних для реплікації вірусної ДНК. По-перше, він є білком-ініціатором, необхідним для ініціації реплікації; по-друге, він володіє ДНК-хеліказною активністю, тобто розплітає ланцюги ДНК перед працюючою ДНК-полімеразою, і, по-третє, Т-антиген потрібний для правильної взаємодії з ДНК ферментного комплексу, що синтезує праймери.

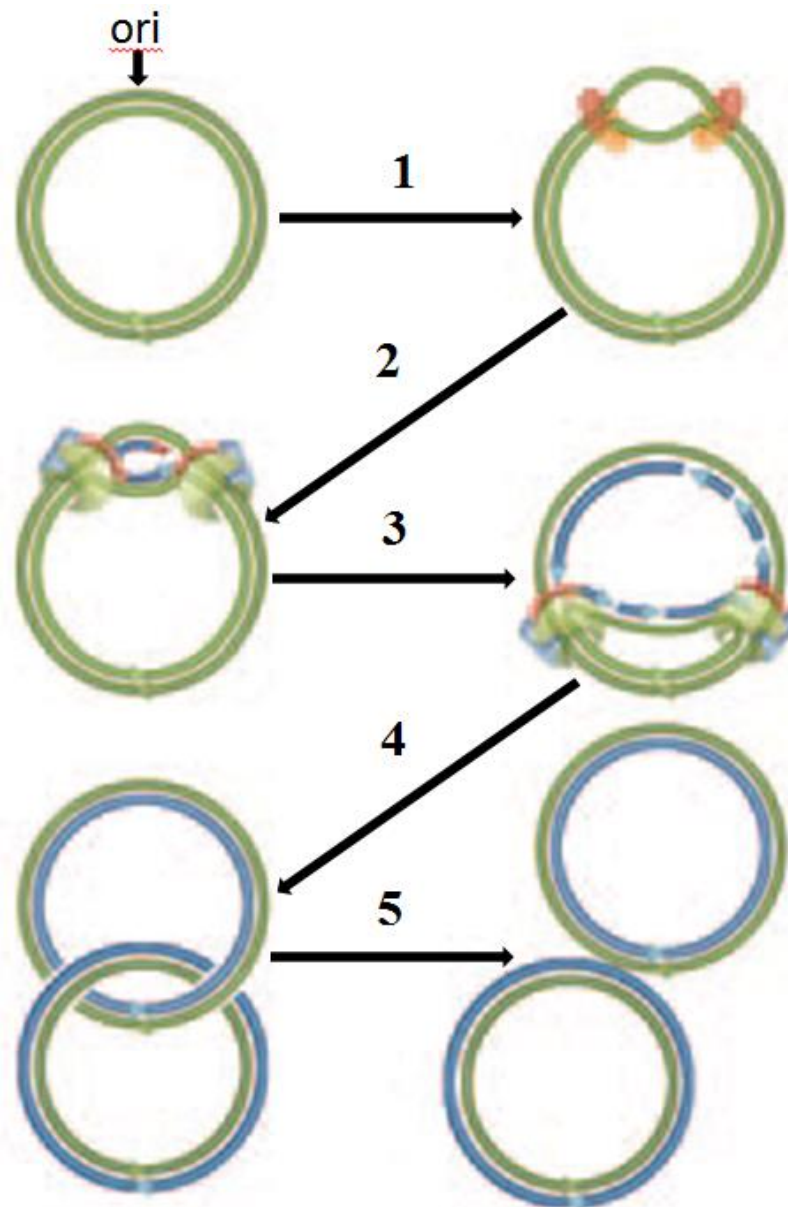
Реплікація деяких інших вірусів, що мають кільцеві длДНК-геноми, відбувається аналогічно реплікації SV40, хоча можливі деякі варіації. Наприклад, у представника сімейства папіломавірусів бичачого вірусу папіломи роль великого Т-антигену виконують два кодовані вірусом білки, Е1 і Е2.

4.3.1.3. Реплікація геномів вірусів, які являють собою лінійну дволанцюгову ДНК, яка здатна замикатися в кільце

До цієї категорії відносяться зокрема патогенні для людини віруси простого герпесу типу 1 і 2 і вірус Епштейна-Барр, він же вірус герпесу типу 4. До цього типу відноситься також бактеріофаг λ , класична модель вивчення експресії генів.

Геном вірусу герпесу 1 типу і його реплікація

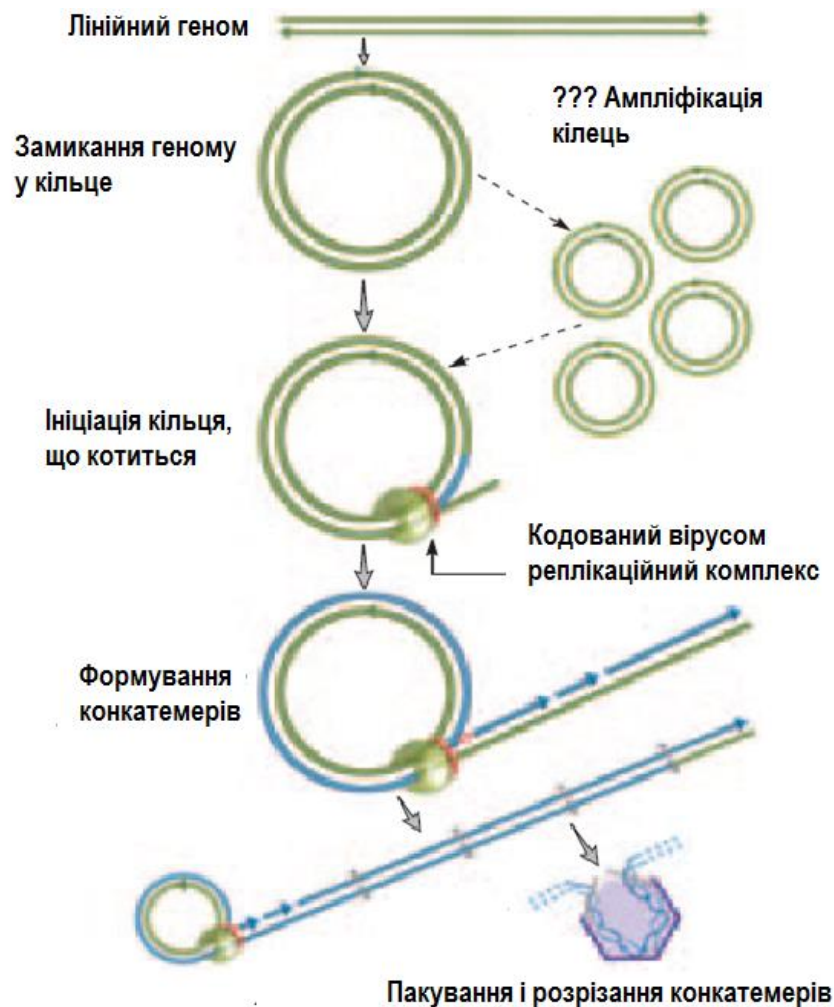
Особливістю генома вірусу герпесу типу 1 є наявність окремого нуклеотиду на 3'-кінці кожного ланцюга. Ці нуклеотиди є комплементарними і обумовлюють замикання ДНК в кільце перед реплікацією. Далі, ряд непрямих даних вказує на можливість, що спочатку відбувається ампліфікація кільцевої ДНК, подібно до реплікації ДНК вірусу SV40, розглянутої вище. Сама реплікація відбувається за участю низки білків, що кодується вірусом. Вірусні білки забезпечують розпізнавання точки початку реплікації, мають активність ДНК-гелікази, зв'язують одноланцюгову ДНК, забезпечують синтез праймерів. Вірусне походження має також ДНК-полімераза. Участь білків клітини-хазяїна в процесі реплікації відносно невелика, але клітина забезпечує топоізомеразу. Конкатемерна ДНК розрізається на геноми однакової довжини тільки при упакуванні в капсиди (мал. 4.26).



Мал. 4.25. Схема реплікації ДНК вірусу SV40. Ori (від англ. origin – початок) – точка початку реплікації. Зеленим кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, блакитним – щойно синтезована ДНК. 1 - Розпізнавання Т-антигеном точки початку реплікації. 2 - ініціація реплікації. 3, 4 - елонгація. 5 - розчеплення.

Реплікація бактеріофага λ

Бактеріофаг λ має лінійний геном, який замикається в кільце при вході в клітину бактерії завдяки липким кінцям, які складаються з 12 комплементарних нуклеотидів, що знаходяться на 5'-кінцях ланцюгів ДНК. На ранній стадії реплікації, ДНК фага реплікується двонаправлено з утворенням близько 20 копій дочірньої кільцевої ДНК на клітину. Потім ініціюється реплікація за допомогою механізму кільця, що котиться, в результаті якої утворюються багато сотень копій дочірніх геномів. Як і у випадку вірусу герпесу, утворюється конкатемерна ДНК, яка розрізається на молекули необхідної довжини при упаковці у вірусні частки. Ці молекули мають такі ж липкі кінці, як і початковий лінійний геном, що ініціював зараження.



Мал. 4.26. Схема реплікації ДНК вірусу герпесу типу 1. Зеленим кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, блакитним – щойно синтезована ДНК.

4.3.1.4. Реплікація геномів вірусів, які представлені лінійною дволанцюговою ДНК, яка не здатна замикатися в кільце

До цієї категорії належить сімейство аденовірусів, що викликають зокрема захворювання дихальних шляхів (застуду), а також сімейство поксвірусів, до якого відносяться віруси натуральної віспи і коров'ячої віспи.

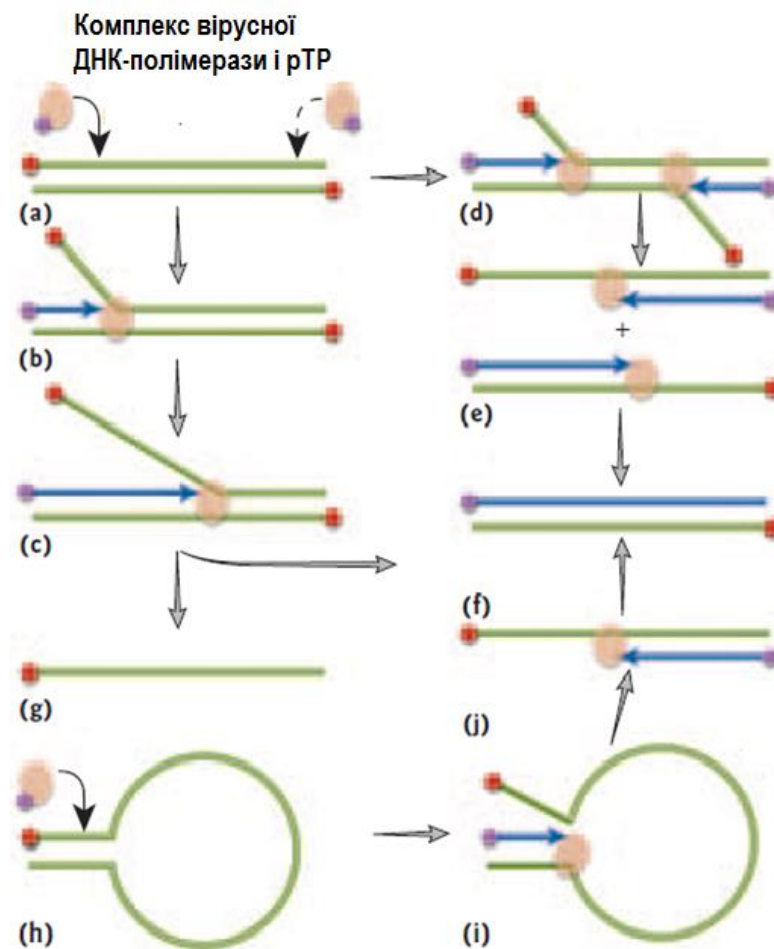
Аденовіруси

Геном аденовірусів є лінійною дволанцюговою ДНК завдовжки близько 36 т.п.н. На двох кінцях є інвертовані термінальні повтори завдовжки 100–150 пар нуклеотидів, які містять точки початку реплікації, до 5'-кінця кожного ланцюга ковалентний прикріплений кодований вірусом білок, названий термінальним білком.

Стратегія реплікації генома аденовірусів зображена на мал. 4.26-1. Точка початку реплікації розпізнається комплексом двох білків вірусу – ДНК-полімерази і попередника термінального білку (мал. 4.26-1, а). Зв'язуванню цього комплексу з ДНК вірусу сприяють два білки клітини-хазяїна, які специфічно зв'язуються з послідовностями, суміжними з точкою початку реплікації. Ці білки є факторами транскрипції, які вірус «запозичує» у клітини для своїх потреб.

Після зв'язування з точкою початку реплікації комплексу ДНК-полімерази і рТР, полімераза починає синтез дочірнього ланцюга ДНК, використовуючи як праймер бічну –ОН групу білку рТР (мал. 4.26-1, б). Таким чином, в якості праймера при синтезі ДНК служить

білок, а не РНК, що є ключовою особливістю вирішення проблеми реплікації кінців у аденовірусів. Далі синтез протікає у напрямі $5' \rightarrow 3'$ уздовж матриці, витісняючи нематричний ланцюг, який зв'язується і стабілізується ДНК-зв'язуючим білком, що кодується вірусом (мал. 4.26-1, с). Цей процес може здійснюватися одночасно з точок реплікації на обох кінцях батьківської ДНК (мал. 4.26-1, d), і батьківські ланцюги розходяться при зустрічі реплікаційних комплексів (мал. 4.26-1, e). Коли використовується тільки одна точка початку реплікації, нематричний ланцюг повністю витісняється (мал. 4.26-1, g), і його реплікація виконується за допомогою утворення проміжного продукту, що має конфігурацію «сковороди з ручкою» (мал. 4.26-1, h), у якого коротка дволанцюгова ділянка повністю відповідає кінцю генома і відповідно має точку початку реплікації. В даному випадку синтез ДНК протікає безперервно, оскільки реплікаційним комплексом синтезується тільки один ланцюг ДНК, і немає ланцюга, що запізнюється.



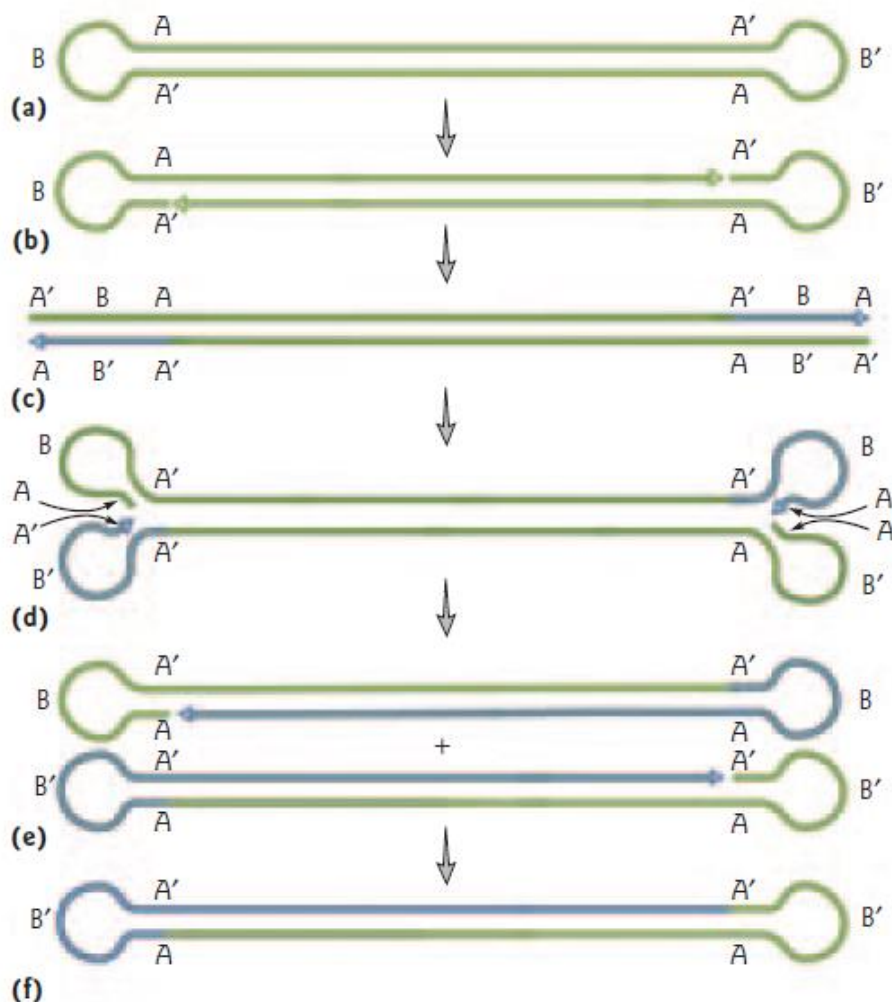
Мал. 4.26-1. Схема реплікації ДНК аденовірусів. Зеленим кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, блакитним – щойно синтезована ДНК. Пояснення див. в тексті.

Поксвіруси

Найбільш вивченим є вірус коров'ячої віспи, який ще називають вірусом вісповакцини, оскільки його використовують при приготуванні вакцини проти натуральної віспи. Геном цього вірусу лінійний, має довжину близько 190 т.п.н. і є незвичайним в тому відношенні, що має ковалентний замкнуті кінці. Це означає, що пари нуклеотидів на кожному кінці пов'язані звичайним $5' \rightarrow 3'$ зв'язком, так що в молекулі ДНК немає вільних 5'- або 3'-кінців. Внаслідок цього, при повній денатурації ДНК вірусу утворюються не два окремі ланцюги ДНК, а одноланцюгова замкнута в кільце ДНК.

Передбачувана модель реплікації наведена на мал. 4.27, хоча слід зазначити, що деталі процесу не є повністю встановленими. Важливо підкреслити, що процес реплікації ДНК вірусу здійснюється в цитоплазмі зараженої клітини, за участю виключно кодованих вірусом білків.

На двох кінцях генома є інвертовані термінальні повтори, які містять декілька генів (4.27, а). Як вважають, віруси коров'ячої віспи використовують особливий механізм вирішення проблеми реплікації кінців їх геномів.



Мал. 4.27. Передбачувана схема реплікації ДНК поксвірусів. Зеленим кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, блакитним – щойно синтезована ДНК, стрілками позначені 3'-кінці. Комплементарні послідовності позначені як **A, A'** і **B, B'**. Дві альтернативні форми послідовностей термінальних петель, **B** і **B'**, міняються з кожною реплікацією; окремі молекули можуть мати петлі або з ідентичними, або з комплементарними послідовностями. Пояснення див. в тексті.

Як вважають, реплікація ініціюється за допомогою розпізнавання і розрізання одного з ланцюгів ДНК в специфічній ділянці в межах інвертованого повтору (4.27, b). Ця ділянка є точкою початку реплікації. Одночасно можуть використовуватися один або обидві такі ділянки на молекулі. Далі ДНК-полімераза рухається у напрямку 3'-кінця, що утворився внаслідок розрізання ланцюгів, поки не досягне кінця матриці (4.27, c). Проте в цій точці полімераза не зупиняється, оскільки завдяки наявності термінальних повторів комплементарні основи поєднуються і знову утворюється матриця для подальшого синтезу ДНК, і синтез

триває у напрямку до середини молекули (4.27, d). Коли дві реплікаційні вилки зустрічаються, дві половини розходяться і реплікація завершується (4.27, e), а кінці ланцюгів з'єднуються (4.27, f).

4.3.1.5. Реплікація геномів вірусів, які мають кільцеву одноланцюгову ДНК

До цієї категорії відносяться зокрема бактеріофаги фХ174 і М13, які є широко використовуваними інструментами в молекулярній біології, а також вірус ТТ людини, яка можливо викликає гепатит (назва вірусу ТТ, відкритого в 1997 році, утворена з ініціалів хворого, у якого він уперше був виявлений).

Першим етапом реплікації одноланцюгових ДНК-геномів є синтез комплементарного ланцюга. Після цього механізм реплікації стає подібним до реплікації дволанцюгових геномів. Найбільш вивченим прикладом є реплікація генома бактеріофага фХ174. Одноланцюгова ДНК, що потрапила в клітину, перетворюється на дволанцюгову форму за допомогою залежного від праймерів РНК синтезу. Далі батьківська ДНК в дволанцюговій формі ампліфікується, а потім відбувається синтез одноланцюгової ДНК механізмом кільця, що котирається, який формує одноланцюгові конкатемери. Ці конкатемери потім розрізаються і замикаються в кільце.

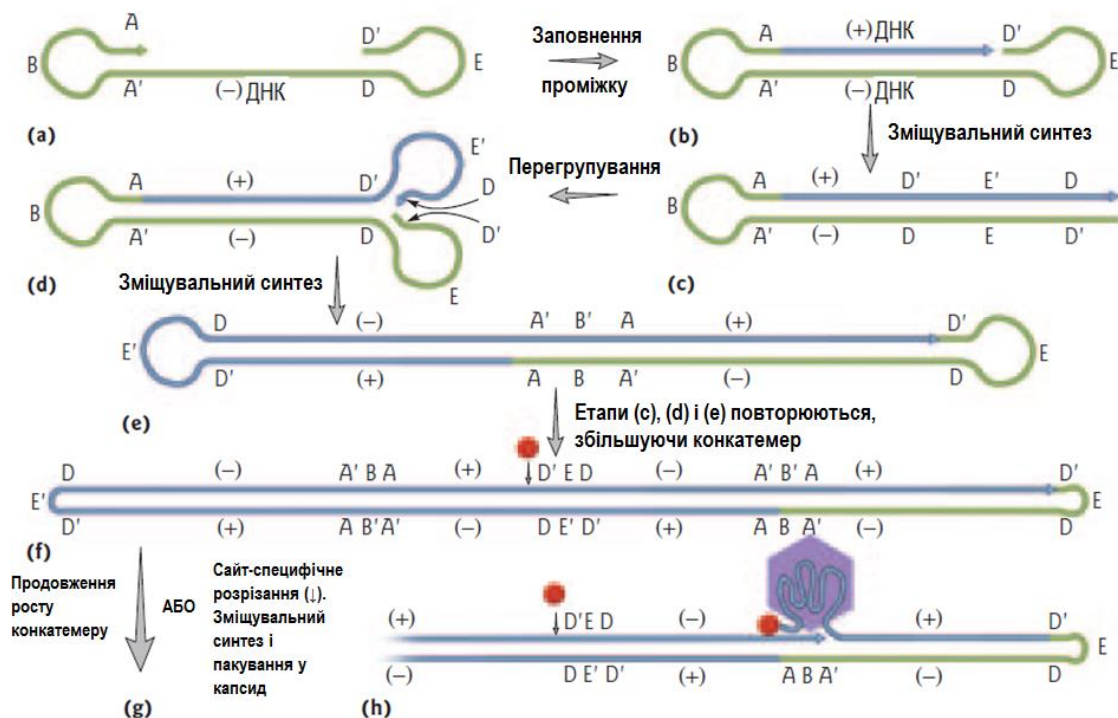
Подробиці реплікації вірусу ТТ людини досі залишаються невідомими.

4.3.1.6. Реплікація геномів вірусів, які мають лінійною одноланцюгову ДНК

До цієї категорії належать автономний парвовірус В19, що вражає людей, і дефектні парвовіруси, що асоціюються з аденовірусами.

Геноми парвовірусів містять термінальні шпильки (інвертовані повтори), які можуть бути свого роду праймерами, оскільки надають ОН-групу для ініціації синтезу ДНК (самопраймування ДНК).

Загальна схема реплікації геномів парвовірусів показана на мал. 4.28.



Мал. 4.28. Схема реплікації ДНК парвовірусів. Зеленим кольором позначені ланцюги батьківської ДНК, блакитним – щойно синтезована ДНК, стрілками позначені 3'-кінці. Червоним кольором показана сайт-специфічна ендонуклеаза. Пояснення див. в тексті.

Важливим першим кроком реплікації парвовірусу є перетворення генома на дволанцюгову форму за допомогою заповнення проміжку (мал. 4.28, а, b). Термінальна шпилька забезпечує 3'-кінець спареної основи з ОН-групою, з якого синтез ДНК може ініціюватися без РНК-праймерів (самопраймування). Зміщення спарених основ на 5'-кінці дозволяє тривати синтезу до досягнення 5'-кінця (мал. 4.28, с). Далі структура зазнає перегруповування (мал. 4.28, d), в результаті якого наново утворюється шпилька, що спочатку існувала на 5'-кінці батьківської ДНК, а також утворюється копія цієї шпильки на 3'-кінці комплементарного ланцюга, який служить праймером для продовження синтезу (мал. 4.28, е). Надалі цикли перегруповування і зміщувального синтезу призводять до утворення тетрамерного спареного ланцюга (мал. 4.28, f), і цей процес може тривати (мал. 4.28, g). Сформовані конкатемери можуть служити інтермедіатами, з яких формується одноланцюгова вірусна ДНК. Розрізи здійснюються на 5'-кінці сайт-специфічним ферментом, який залишається прикріпленим до 5'-кінця. 3'-кінець з ОН-групою діє як праймер для зміщувального синтезу, який супроводить упаковка одноланцюгової ДНК у віріони.

Як тільки зміщується і упаковується увесь геном, надмірний дочірній геном розщеплюється ендонуклеазами, що призводить до вивільнення вірусних часток.

Дефектні парвовіруси відрізняються тим, що мають термінальні послідовності шпильок, комплементарні одна іншій. В результаті цього 5'-кінці (+) і (–) ланцюгів є ідентичними, тому розрізання ДНК на 5'-кінці сайт-специфічним ферментом, зміщувальний синтез і упаковка в капсид проходять однаково для кожного ланцюга.

4.3.2. Реплікація геномів вірусів, які містять РНК

Реплікація РНК-геномів потребує активності РНК-залежної РНК-полімерази, яка повинна забезпечуватися вірусом. Впродовж процесу реплікації РНК вірусу, як і при усіх інших процесах синтезу нуклеїнових кислот, ланцюг матриці прочитується полімеразою у напрямі 3'→5', тоді як ланцюг, що синтезується, починається з 5'-нуклеотиду і синтезується у напрямку до 3'-кінця. Більшість вірусів, що містять РНК, можуть реплікуватися у присутності інгібіторів синтезу ДНК, що свідчить про відсутність ДНК-інтермедіатів. Проте ретровіруси використовують проміжний синтез ДНК.

РНК-залежні РНК-полімерази, кодовані вірусом, повинні транспортуватися в клітину або одночасно з вірусною часткою, або синтезуватися незабаром після зараження. Вірусні РНК-залежні РНК-полімерази часто називають «репліказами», щоб відрізнити їх від РНК-полімераз, задіяних в процесі транскрипції. Проте обидва ці процеси виконуються тими самими ферментами, які на різних етапах інфекційного циклу можуть проявляти різні синтетичні активності.

РНК-геноми вірусів можуть бути одноланцюговими і дволанцюговими, і одноланцюгові можуть містити (+) і (–) РНК. Молекули РНК, які є вірусним геномом, існують тільки як лінійні молекули, хоча у таких інфекційних агентів, як віроїди, геномна РНК замкнута в кільце.

Особливістю багатьох вірусів, які містять РНК, є те, що їх геном складається з множинних сегментів, аналогічно хромосомам клітини-хазяїна. З цієї причини зріла вірусна частка повинна містити принаймні одну копію кожного сегменту, щоб вона зберігала повну інфекційність. У вірусів, які містять ДНК, сегментація генома спостерігається у край рідко. Впродовж процесу реплікації, молекула РНК залишається лінійною, і ковалентний замкнуті в кільце молекули не спостерігаються ніколи.

Усі ферменти, які беруть участь в синтезі РНК, вірусу або клітини-хазяїна, не здатні до

так званого пруфрингу, тобто до виправлення помилок азотистих основ, які невірні спарувалися. В той же час при синтезі ДНК така перевірка відбувається. Відсутність пруфрингу означає, що РНК-геноми мутують набагато легше, ніж ДНК-геноми. Оцінки показують, що впродовж реплікації РНК помилки відбуваються з частотою від 10^{-3} до 10^{-5} на одну азотисту основу на одну подію реплікації генома. Інакше кажучи, в середньому відбувається одна мутація на 1000-100000 нуклеотидів на одну подію реплікації генома. Це набагато вище, ніж у ДНК-геномів. З цієї причини еволюція РНК-вірусів відбувається набагато швидше, ніж еволюція ДНК-вірусів. Висока вірогідність мутацій також ймовірно накладає обмеження на розмір РНК-генома, оскільки при його збільшенні збільшується вірогідність мутацій в критичних частинах генома.

4.3.2.1. Регуляторні елементи синтезу вірусного РНК-генома

В процесі реплікації усіх РНК-вірусів деякі особливості є загальними. Для синтезу точної копії генома, РНК-залежні РНК-полімерази повинні починати синтез з 3'-термінального нуклеотиду матричного ланцюга. Тому 3'-кінець повинен містити сигнал ініціації синтезу.

Як витікає з принципів, на підставі яких побудована класифікація Д. Балтімора, усі віруси з РНК-геномами повинні реплікуватися через проміжну дволанцюгову РНК. Наприклад, вірус з одноланцюговою геномною РНК повинен утворювати дволанцюговий проміжний продукт за допомогою синтезу «антигеномного» ланцюга комплементарної РНК. Цей «антигеномний» ланцюг, у свою чергу, має бути використаний як матриця для синтезу дочірніх геномів, які будуть упаковані у вірусні частки. Як і з початковим ланцюгом, синтез повинен розпочинатися з термінального 3'-нуклеотида, щоб синтезувати геном повної довжини. Таким чином, цей «антигеномний» ланцюг РНК також повинен містити сигнал початку синтезу для полімерази. Для більшості вірусів механізм ініціації синтезу РНК погано зрозумілий. Проте, останніми роками були встановлені регуляторні елементи на кінцях РНК, які направляють синтез РНК.

У деяких РНК-вірусів послідовності на кінцях генома майже повністю комплементарні одна іншій, тобто є інвертованими повторами. У такому випадку 3'-кінці ланцюгів генома і «антигенома» будуть практично однаковими, тобто містити одні і ті ж послідовності, що ініціюють синтез РНК. У вірусів, у яких немає термінальних інвертованих повторів, ініціація синтезу геномної і «антигеномної» молекул повинна контролюватися різними механізмами.

В деяких випадках між кінцями РНК-геномів спостерігаються відмінності. Так, до 5'-кінця може бути ковалентний прикріплений білок, що спостерігається у пікорнавірусів, і довгий полі(А) хвіст на 3'-кінці багатьох (+)РНК геномів, як це спостерігається у пікорнавірусів, альфавірусів, флавівірусів і коронавірусів.

4.3.2.2. Реплікація геномів вірусів, представлених дволанцюговою РНК (клас 3 за класифікацією Д. Балтімора)

Важливими вірусами, що відносяться до класу 3 по класифікації Д. Балтімора, є реовіруси (викликають ОРЗ), ротавіруси (викликають кишковий грип, можуть викликати і важку діарею у дітей), і орбівіруси, що вражають овець і інших тварин.

Віруси класу три у своєму геномі містять множинні сегменти длРНК. У реовірусів геном складається з 10 сегментів, кожен з яких реплікується незалежно від іншого. По аналогії з реплікацією ДНК, дволанцюгова РНК могла б бути синтезована напівконсервативним механізмом, при якому кожен ланцюг батьківської РНК утворював би дуплекс з комплементарним ланцюгом дочірньої РНК. Проте фактично реплікація генома, представленого дволанцюговою РНК, виконується консервативно.

Проблема, з якою стикаються віруси, що мають у геномі дволанцюгову РНК, полягає в тому, що длРНК є потужним потенційним індуктором низки клітинних захисних механізмів, які включають глушіння (сайленсинг) РНК, утворення інтерферону і апоптоз (див. розділ, присвячений механізмам противірусного імунітету). Більшість длРНК-геномних вірусів вирішують цю проблему таким чином, що вірусна дволанцюгова РНК завжди оточена білками вірусу у субвірусних частках і ніколи не виявляється у вільному вигляді у цитоплазмі, де вона могла б викликати імунні реакції.

Після зараження клітини, декілька білків віріона реовірусу видаляються протеазами в процесі роздягання капсиду з формуванням субвірусних часток, які виявляються в цитоплазмі, де відбувається реплікація. Дволанцюговий РНК-геном залишається усередині субвірусних часток і не покидає їх впродовж циклу реплікації. Єдиною РНК вірусу, знайденою в цитоплазмі поза зв'язком з субвірусними частками, є мРНК. Ця РНК синтезується в процесі транскрипції, здійснюваним пов'язаною з вірусними частками РНК-залежною РНК-полімеразою. Оскільки обидва ланцюги вихідної батьківської РНК залишаються в субвірусній частці, очевидно, що транскрипти одноланцюгової мРНК служать єдиними носіями в передачі генетичної інформації потомству. Це означає, що тільки одна нитка кожного з 10 геномних сегментів використовується як матриця для синтезу РНК, і ця знову синтезована РНК далі реплікується з утворенням нових сегментів геномної дволанцюгової РНК. Наново синтезована (–)РНК виявляється тільки в комплексі з незрілими вірусними частками як частина дволанцюгової РНК і ніколи не виявляється в клітині у вільному стані. Кожна частка містить єдину копію кожного з 10 сегментів генома реовірусів. Механізм, за допомогою якого у віріон специфічно упаковується по одному з 10 сегментів, залишається незрозумілим.

4.3.2.3. Реплікація геномів вірусів, представлених одноланцюговою (+) РНК (клас 4 за класифікацією Д. Балтімора)

Важливими в практичному стосунку вірусами цієї категорії є пікорнавіруси, до числа яких належать поліовірус, вірус гепатиту А, вірус ящура і риновіруси, які викликають нежить і застуду. Також до цієї групи входять коронавіруси, до яких належить вірус, що викликає атипову пневмонію, і віруси інших сімейств, зокрема вірус, що викликає краснуху, вірус гепатиту С і вірус, що викликає жовту лихоманку.

У таких деталях циклів реплікації вірусів, які належать до класу 4 в класифікації Балтімора, як експресія генів або збирання вірусних часток, є значна різноманітність, проте процеси реплікації їх (+)РНК-геномів дуже схожі. Основні деталі реплікації геномів цих вірусів були отримані з використанням пікорнавірусів.

Після зараження, геномна РНК вірусу повинна служити матрицею для трансляції і транскрипції. Ця РНК має полі(А) хвіст на 3'-кінці і невеликий білок, що складається з 22 амінокислот, названий VPg, на 5'-кінці. Цей прикріплений до РНК білок мають тільки пікорнавіруси. Трансляція є необхідним першим кроком інфекційного циклу, в результаті її синтезується білок-полімераза, який синтезуватиме нові геноми. Реплікація протікає на гладких цитоплазматичних мембранах в реплікаційних комплексах. Як передбачає схема Балтімора, реплікація включає утворення інтермедіата у вигляді дволанцюгової РНК. Ініціація реплікації відбувається на 3'-кінці (+)РНК, який містить полі(А) хвіст, наявність якого є істотною для реплікації.

Процес ініціації реплікації РНК пікорнавірусів залишається неясним, також залишається невідомим, яким чином білок VPg виявляється прикріпленим до 5'-кінців наново синтезо-

ваних РНК. Цей білок виявляється прикріпленим як до (+) ланцюгів РНК, так і до (–) ланцюгів. Після початку реплікації, полімераза проходить по усій довжині матриці РНК. Процес реплікації вимагає супутнього синтезу білку, оскільки додавання інгібіторів синтезу білку після початку реплікації інгібує подальшу реплікацію.

Аналіз вірусних РНК в заражених пікорнавірусами клітинах показує, що комплекси реплікації містять частково одноланцюгові РНК, і частково дволанцюгові РНК. (–)РНК виявляється тільки в комплексі з (+)РНК. Передбачається, що спочатку (+)РНК використовується як матриця для синтезу комплементарної антигеномної (–)РНК, яка на 5'-кінці має білок VPg. Ймовірно, ці два комплементарні ланцюги пов'язані слабо, можливо тільки в регіоні, де протікає синтез. Тому у міру переміщення полімерази, 3'-кінець звільняється для наступного раунду реплікації, хоча попередня полімераза ще не досягла кінця матриці. Показано, що в один і той же час з РНК-матрицею пікорнавірусів можуть бути пов'язані до п'яти реплікаційних комплексів. Знову синтезована (–)РНК у свою чергу починає використовуватися як матриця для синтезу нових копій геномної РНК, у якої до 5'-кінця виявляється прикріпленим білок VPg.

Оскільки при реплікації утворюється набагато більше геномних (+)РНК, ніж (–)РНК, процес синтезу має бути зміщеним, асиметричним. Повністю синтезовані (+)РНК вивільняються з реплікаційного комплексу і або упаковуються у віріон, або використовуються як матриці для подальшої реплікації, або використовуються як мРНК для трансляції (і при цьому втрачають білок VPg).

За оцінками, у інфікованій поліовірусами клітині синтезується 2500 молекул РНК за хвилину. Вірус контролює процес синтезу РНК таким чином, що синтезується у 50 разів більше (+)РНК, ніж (–)РНК.

У інших вірусів 4 класу за класифікацією Балтімора, ніж пікорнавіруси, білок VPg відсутній. Реплікація синтезу РНК цих вірусів також ініціюється в 3'-кінці геномної або антигеномної РНК, і синтез також виконується в реплікаційних комплексах. Передбачається, що реплікаційний процес в усіх випадках є схожим.

4.3.2.4. Реплікація геномів вірусів, представлених одноланцюговою (–)РНК (клас 5 за класифікацією Д. Балтімора)

Важливими вірусами цієї групи є вірус кору, вірус грипу, вірус сказу, вірус геморагічної лихоманки Ебола, вірус геморагічної лихоманки церкопитеків («хвороби зелених мавп»).

Віруси класу 5 розділяються на дві групи – з геномом, представленим однією молекулою, і з сегментованим геномом. Деталі реплікації РНК вірусів класу 5 багато в чому не ясні, але вважають, що загальні закономірності однакові, незалежно від того, скільки молекул РНК входить в геном. Важливою особливістю реплікації усіх вірусів цього класу є наявність комплементарних послідовностей на кінцях геномної РНК. Оскільки (–)РНК не може безпосередньо транслюватися у білок, синтез РНК у вірусів цього класу може здійснюватися тільки за наявності РНК-залежною РНК-полімерази, яка є присутньою у вірусній частці.

Реплікація несегментованого РНК-генома у рабдовірусів

Найбільша кількість інформації є стосовно процесу реплікації у рабдовірусів, особливо для вірусу везикулярного стоматиту (ВВС). Сучасні дані показують, що пропонується для цих вірусів модель є загальною для багатьох інших вірусів цього класу.

Геномна (–)РНК і антигеномна (+)РНК, утворювана в результаті реплікації, у ВВС завжди тісно пов'язані з трьома білками вірусу в спіральному комплексі. Найбільш явним є нуклеопротеїн (NP), в менших кількостях представлений фосфопротеїн (Р), і тільки декількома молекулами представлений великий (L) білок. Білок L є каталітичним компонентом

реплікаційного комплексу, проте для його активності потрібні також два інші білки. Цей комплекс здійснює як транскрипцію генома з утворенням мРНК, так і реплікацію геномної РНК. Залишається невідомим, як контролюється перемикання цього комплексу від одного виду активності до іншого.

Реплікація вірусів 5 класу вимагає безперервного синтезу білку. Отже, синтез вірусної мРНК і білка повинен відбуватися до настання реплікації. Як і в усіх випадках синтезу нуклеїнових кислот, реплікація починається на 3' кінці (–)РНК-матриці з утворенням (+)РНК. Завдяки наявності термінальних комплементарних послідовностей, на 3'-кінці цієї антигеномної РНК також є присутньою послідовність для зв'язування полімерази і ініціації транскрипції.

Усередині зараженої клітини часто спостерігаються округлі нуклеокапсиди, що вказує на взаємодію кінців РНК з утворенням фігури, подібній сковороді з ручкою. Утворення кільця може бути необхідним процесом при реплікації, хоча залишається неясним чому.

У перебігу реплікації полімераза ігнорує сигнал термінації синтезу мРНК, який є функціональним при транскрипції. Антигеномна РНК далі служить в якості матриці для синтезу геномної (–)РНК. Ці РНК виявляються в структурі нуклеокапсиду і можуть бути використані в нових циклах реплікації перед включення у вірусні частки. У зараженій клітині синтезується набагато більше геномної (–)РНК, ніж (+)РНК, таким чином процес реплікації являється асиметричним.

Реплікація сегментованого РНК-генома у ортоміксовірусів

Як і попередня група вірусів з несегментованим геномом, у вірусів з сегментованим геномом сегменти також формують спіральні структури нуклеокапсидів. У вірусу грипу основним білком нуклеокапсиду також є нуклеопротеїн NP. До складу нуклеокапсиду входять ще три білки – PA, PB1 і PB2. Кожен сегмент реплікується незалежно. Як і у випадку ВВС, білки нуклеокапсиду здійснюють як транскрипцію геномної РНК, так і її реплікацію, і залишається невідомим, які механізми контролюють перемикання одного виду активності на інший.

При реплікації реплікаційний комплекс не реагує на сигнал зупинки трансляції і поліаденілювання, і реплікація триває до кінця молекули. Синтезована (+)РНК, яка залишається в нуклеокапсидному комплексі, править за матрицю для синтезу геномної (–)РНК, яка у свою чергу може використовуватися для подальших раундів реплікації перед формуванням нових віріонів.

Механізм контролю включення сегментів генома при зборці вірусних часток залишається невідомим. Можливо, кожна вірусна частка може містити більше за одну копію кожного сегменту, що робить можливою рекомбінацію вірусного генома. Проте чи відбуваються подібні події *in vivo*, залишається неясним.

4.3.3. Реплікація РНК-вірусів через стадію ДНК і ДНК-вірусів через стадію РНК

Низка вірусів в процесі реплікації міняє природу свого генетичного матеріалу з РНК-форми на ДНК-форму і навпаки. Спочатку можливість синтезу ДНК на матриці РНК сприймалася як ересь. Нині цей факт твердо встановлений, активно використовується в молекулярній біології. Виявилось, що значна частина генома ссавців, у тому числі і людини, сформувалася саме таким шляхом.

Процес синтезу ДНК на матриці РНК називається зворотною транскрипцією.

4.3.3.1. Цикл реплікації ретровірусів

Важливими вірусами сімейства ретровірусів є вірус імунодефіциту людини, що викликає пандемію СНІДУ, а також Т-лімфотропний вірус людини — ретровірус, який викликає такі

злоякісні новоутворення лімфоїдною і кровотворною тканин, як Т-клітинний лейкоз і Т-клітинну лімфому у дорослих.

Віріони усіх ретровірусів містять дві ідентичні молекули одноланцюгової геномної РНК, які пов'язані одна з іншою. Ці РНК мають послідовність з (+) сенсом, також вони мають характерні особливості мРНК еукаріот, такі як структуру кепа на 5'-кінці і полі(А) хвіст на 3'-кінці. Незважаючи на це, геномні РНК ніколи не транслюються після попадання вірусу в клітину. Замість цього, вони використовуються як матриці для синтезу дволанцюгових молекул ДНК. Цей процес, що називається зворотною транскрипцією, відбувається в цитоплазмі усередині вірусної частки. Далі ДНК переміщається в ядро клітини хазяїна, де вона вбудовується в геном хазяїна. Цю ДНК називають провірусом. Далі на цій ДНК, що має вірусне походження, синтезуються молекули мРНК, які можуть або транслюватися, або упаковуватися у вигляді дочірніх геномів у вірусні частки.

Зворотна транскриптаза володіє трьома ферментативними активностями. По-перше, вона здійснює зворотну транскрипцію, тобто синтез ДНК на матриці РНК. По-друге, вона є ДНК-залежною ДНК-полімеразою, тобто синтезує ДНК на ДНК-матриці. У третій, вона є РНКазой Н, розщеплюючи ланцюг РНК в гібриді РНК:ДНК.

Як і інші ДНК-полімерази, зворотна транскриптаза вимагає РНК-праймера. Ретровіруси дуже цікаві в цьому відношенні, оскільки в якості праймера використовують транспортну РНК хазяїна. Ця тРНК зв'язується за допомогою спаровування азотистих основ з геномною РНК вірусу поблизу 5'-кінця. Кожен ретровірус містить у віріоні специфічний тип тРНК, наприклад вірус саркоми Рауса має триптофанову тРНК, вірус лейкемії мишей Молоні містить пролінову тРНК, а ВІЛ – лізинову тРНК. Залишається незрозумілим, як вибираються ці тРНК, але цілком імовірно, що важливим детермінантом вибору є сайт зв'язування тРНК в геномній РНК.

Зворотна транскриптаза потрапляє в клітину разом з віріоном. Зворотна транскрипція виконується без повного роздягання вірусного генома. Це пояснює зокрема той факт, що, попри те, що вірусний геном має усі особливості мРНК, він ніколи не транслюється: рибосоми хазяїна просто не мають до нього доступу.

Процес зворотної транскрипції, наведений на мал. 4.29, є складним і включає багато етапів з двома стрибками.

Якщо порівняти послідовності геномної РНК вірусу і провірусної ДНК, яка на ній синтезується, то виявляється, що дві молекули не є точно колінеарними (мал. 4.29). Прямі повтори, які присутні на 5'- і 3'-кінцях геномної РНК і примикають до кепа і полі(А) хвоста, виявляються внутрішніми в молекулі провірусної ДНК. Інакше кажучи, зовні них в дволанцюговій ДНК було додано додаткові послідовності. Причина цього лежить в механізмі зворотної транскрипції. Зрештою, ДНК провірусу на своїх кінцях має довгі кінцеві повтори (long terminal repeats, LTRs), які важливі для інтеграції вірусу в геном хазяїна і транскрипції (див. нижче).

Інтеграція провірусної ДНК в геном клітини

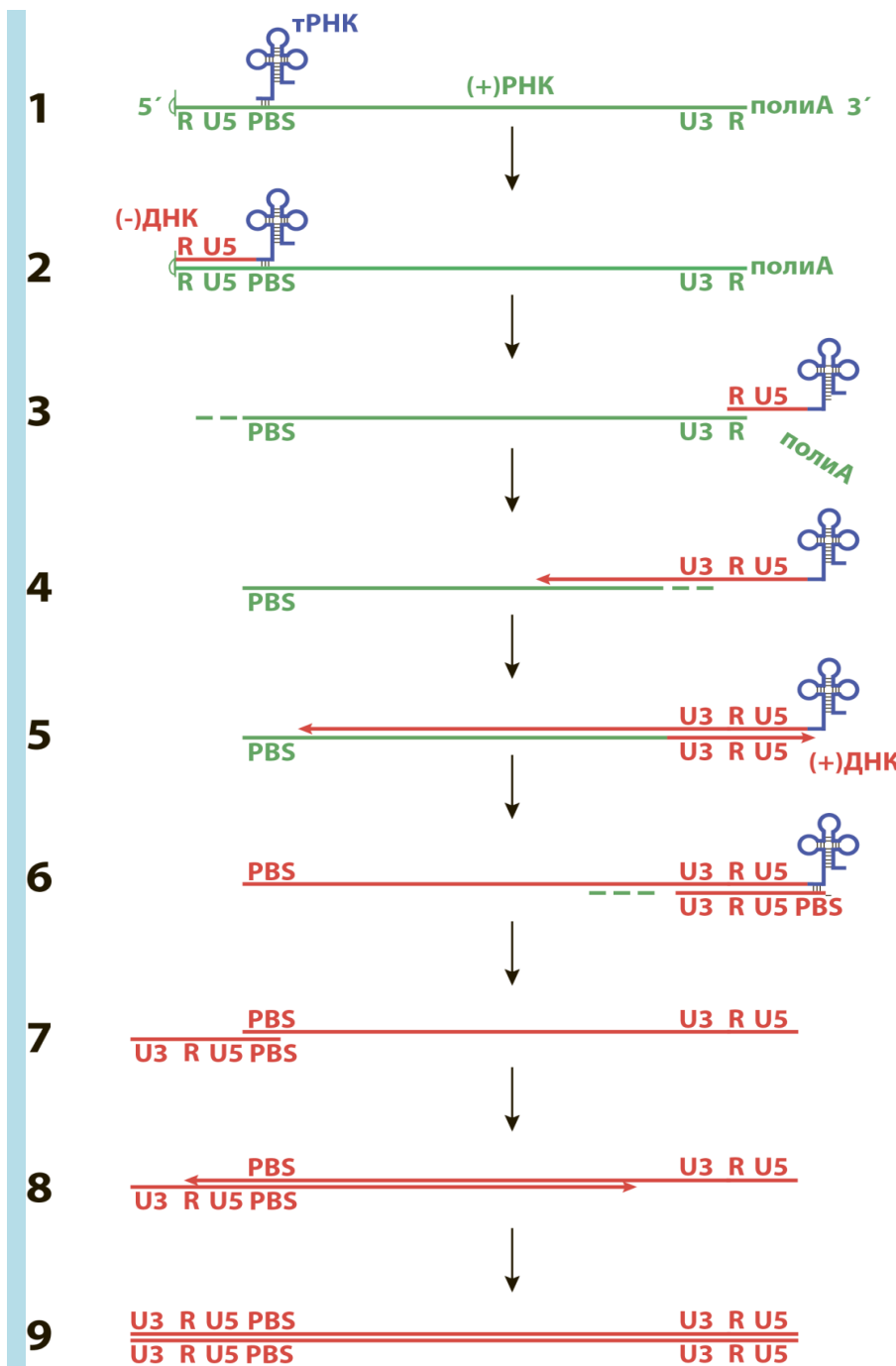
Провірусна ДНК синтезується в цитоплазмі у складі частково роздягненої вірусної частки. Ця ДНК далі мігрує в ядро клітини, де об'єднується з клітинною ДНК. Інтеграція вимагає наявності ще одного вірусного білку, що називається інтегразою. Цей білок міститься у вірусній частці і потрапляє в ядро разом з провірусом.

Після попадання в ядро ДНК провірусу переходить в кільцеву форму. Потім в місцях стику LTR виникає короткий інвертований повтор, що виконує функцію специфічної діля-

нки інтеграції. Ця ділянка пізнається вірусною ферментом-інтегразою, який вносить ступінчасті розриви в LTR і клітинну ДНК. Цей же фермент здійснює і з'єднання ланцюгів ДНК. Зрештою, інтеграція стає безповоротною.

Заражені клітини в типовому випадку містять від 1 до 20 копій інтегрованої провірусної ДНК. Для інтеграції в геномі хазяїна немає специфічного сайту, провірусна ДНК вбудовується випадково, хоча і є деякі переважні ділянки, зокрема регіони з активними генами. Вірусспецифічна ДНК реплікується разом з клітинною ДНК при мітозі і передається в дочірні клітини. Власно кажучи, клітина вже не може її якось позбутися.

У більшості ретровірусів інтеграція може відбуватися тільки в клітинах, які зазнають ділення. Вважають, що це пов'язано з нездатністю комплексу ДНК провірусу з білками пройти через ядерну оболонку; руйнування ядерної оболонки у момент мітозу роблять хромосоми хазяїна доступним для інтеграції. Проте таке обмеження не поширюється, наприклад, на ВІЛ, оскільки до складу білків, пов'язаних з провірусною ДНК, входять білки, опосередковуючі транспорт в ядро. Тому ВІЛ може заражати клітини, що покояться.



Мал. 4.29. Механізм зворотної транскрипції. РНК позначена зеленим кольором, тРНК - синім, а ДНК червоній. 1. тРНК зв'язується з геномною (+)РНК, яка має кап на 5'-кінці і полі(А) хвіст на 3'-кінці, з допомогою сайту приєднання праймера (primer-binding site, PBS). 2. 3'-ОН група тРНК слугує праймером для синтезу ДНК-копії 5'-кінця РНК. 3. РНКазою Н видаляється ланцюг РНК в дуплексі РНК:ДНК, потім відбувається перший стрибок: ДНК зв'язується з послідовністю повтору R на іншому кінці РНК. 4. Нарощування ланцюга ДНК і часткове видалення ланцюга РНК в дуплексі РНК:ДНК РНКазою Н. 5. Синтез 3'-кінця другого ланцюга ДНК. 6. Видалення ланцюга РНК РНКазою Н. 7. Другий стрибок: два ланцюги ДНК за рахунок спаровування комплементарних азотистих основ зв'язуються в сайті PBS. 8. Завершення синтезу обох ланцюгів ДНК. 9. Провірус, що складається з дволанцюгової ДНК. В результаті зворотної транскрипції утворюються молекули дволанцюгової ДНК з довгими (декілька сотень нуклеотидів) кінцевими повторами, що мають структуру U3RU5.

У більшості випадків події інтеграції ретровірусів відбуваються в соматичних клітинах. Проте в різні моменти еволюційної історії безперечно відбувалася інтеграція ретровірусів в статеві клітини людини і інших видів. Такі події привели до появи ендогенних ретровірусів, які поводяться як звичайні генні локуси. Більшість цих локусів несуть мутації, які запобігають утворенню на них вірусів. Проте іноді вони здатні почати продукувати вірусні частки за певних умов.

Продуктування дочірніх геномів ретровірусів

Нові РНК-геноми ретровірусів транскрибуються на інтегрованій провірусній ДНК. В усіх відносинах цей процес подібний до утворення клітинних мРНК. Клітинна ДНК-залежна РНК-полімераза II транскрибує провірус, і первинний транскрипт кепується і поліаденілюється ферментами хазяїна.

Геноми потомства повинні точно відповідати батьківському геному, з якого був утворений провірус, інакше успішної реплікації вірусу не буде. Для того, щоб це сталося, транскрипція повинна початися точно в 5'-кінці елементу R лівобічного LTR (мал. 4.29). Промотор РНК-полімерази II розташований зліва від точки старту транскрипції. Якби провірус був просто копією РНК-генома, то зліва від стартової точки транскрипції не було б ніякої кодованої вірусом послідовності, яка могла б служити промотором, і в цьому випадку транскрипція вірусної РНК залежала б від випадкового вбудовування безпосередньо біля якого-небудь промотора хазяїна. Це пояснює, чому утворення LTRs впродовж зворотної транскрипції настільки важливе. Завдяки лівій LTR кодована вірусом послідовність, U3, розташована зліва від необхідної точки початку транскрипції і вона і забезпечує необхідний промотор для початку транскрипції точно в 5'-кінці елементу R. Подібним чином, з іншого кінця генома сайт поліаденілювання повинен починатися точно на 3'-кінці елементу R правого LTR. Оскільки для визначення точної позиції сайту поліаденілювання важливі послідовності ліворуч і праворуч цього сайту, то праву послідовність забезпечує елемент U5. Таким чином, формування довгих термінальних послідовностей має ключове значення для правильної реплікації вірусної нуклеїнової кислоти.

4.3.3.2. Цикл реплікації гепаднавірусів (параретровірусів)

Важливим вірусом цієї групи є вірус гепатиту В людини, що викликає хронічне захворювання печінки і є однією з причин гепатоцелюлярної карциноми.

Геном вірусу складається з частково дволанцюгової ДНК. Він представлений двома ланцюгами лінійної ДНК, які формують кільце за допомогою спаровування азотистих основ. (–) Ланцюг ДНК ковалентно пов'язаний з кодованим вірусом білком Р на 5'-кінці і утворює повне кільце, що перекривається. (+) Ланцюг ДНК перекриває 5'–3' з'єднання (–)ДНК і грає роль клейкого кінця у формуванні геномного кільця; він завжди неповний (мал. 4.30А).

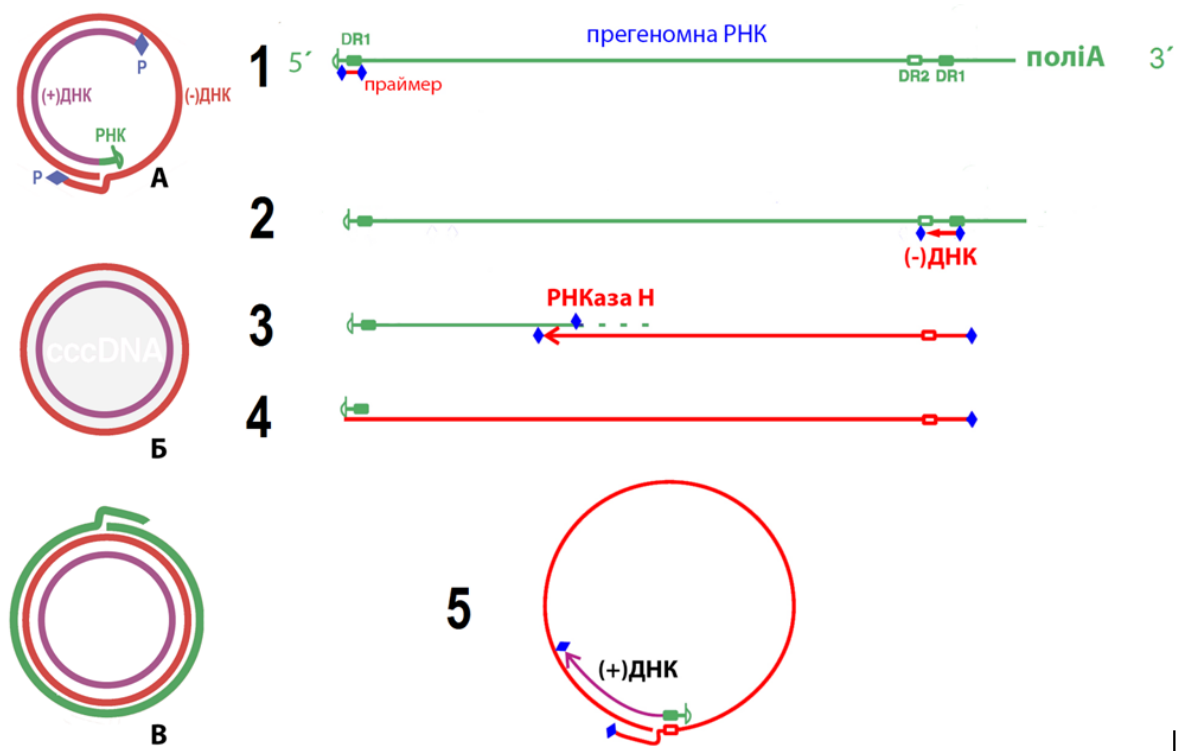
Коли частка вірусу гепатиту В людину входить в клітину, геном транспортується в ядро, де білок Р видаляється, ДНК ковалентно замикається і добудовується з утворення дволанцюгового кільця (малюнок 4.30Б). На відміну від ретровірусів, геном гепаднавірусів не вбудовується в геном хазяїна перед транскрипцією.

Далі кільце ДНК транскрибується РНК полімеразою II хазяїна. В процесі транскрипції утворюється низка мРНК, які виходять в цитоплазму. Серед цих РНК є один тип, який включається в дочірній капсид, так звана прегеномна РНК. Ця РНК має кінцеві повтори, оскільки охоплює більш ніж довжину кола кругової матриці, і кодує білок Р (мал. 4.30В). Цей білок є поліфункціональним, маючи активність зворотної транскриптази/ДНК-полімерази і РНКазу Н.

Після синтезу, білок Р взаємодіє із специфічною послідовністю, що примикає до 5'-

кінця РНК, і опосередкує упаковку цієї прегеномної РНК у вірусну частку. Після цього починається синтез геномної ДНК в процесі зворотної транскрипції.

Термінальний домен білка Р служить як праймер для синтезу (–)ДНК за участю домену зворотної транскрипції. З цієї причини цей білок виявляється ковалентний пов'язаним з 5'-кінцем геномної (–)ДНК. Після синтезу короткого фрагмента (–)ДНК (мал. 4.30, 1), цей фрагмент разом з білком Р переміщається на іншу копію повтору на 3'-кінці РНК, тобто відбувається перший стрибок полімерази при зворотній транскрипції гепаднавірусу. Синтез ДНК триває, і у міру синтезу ДНК за рахунок активності РНКаз Н руйнується матриця РНК (мал. 4.30, 2-4). Специфічний олігонуклеотид РНК на крайньому 5'-кінці, який містить повтор DR1, уникає руйнування. Він переноситься на другий повтор, DR2, біля 5'-конца синтезованої (–)ДНК, де служить праймером для синтезу короткої послідовності (+)ДНК на 5'-кінці матриці. Для продовження синтезу потрібний другий стрибок. Синтезований фрагмент (+) ДНК, що містить DR2, переходить на іншу копію DR1 на другому кінці матриці (–) ДНК (мал. 4.30, 5), і синтез (+) ланцюга триває. Дуже незвичайним є те, що вірусна частка покидає клітину раніше, ніж завершується синтез другого ланцюга ДНК. Через вихід з клітини вірусної частки стають недоступними субстрати для синтезу ДНК, синтез (+) ланцюга припиняється, і в нормі вірусні частки містять тільки частково дволанцюгову ДНК.



Мал. 4.30. Механізм реплікації генома гепаднавірусів. Ліворуч: А – геном гепаднавірусів; Б – формування дволанцюгового ДНК-генома в ядрі клітини; В - синтез прегеномної РНК, яка охоплює більш ніж довжину кола кругової матриці ДНК. Справа: 1...5 - етапи зворотної транскрипції. Пояснення см в тексті. РНК позначена зеленим кольором, (–)ДНК – червоним, (+)ДНК – пурпурним. Синім кольором позначений білок Р.

4.3.3.3. Інші віруси, що використовують стратегію зворотної транскрипції

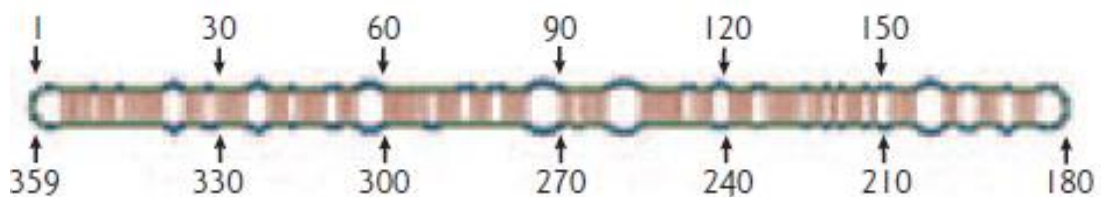
Використання зворотної транскрипції для реплікації генома не обмежується ретро- і гепаднавірусами людини. Подібну стратегію використовують також вражаючі рослини каулімовіруси, наприклад вірус мозаїки цвітної капусти. Подібно до вірусу гепатиту В людини, цей вірус має геном у вигляді кільцевої дволанцюгової ДНК, в якому є повний, але такий, що містить розрив (–) ланцюг і неповний (+) ланцюг. Проте, аналогічно до ретровірусів,

праймером для синтезу (–)ДНК служить транспортна РНК клітини хазяїна.

4.3.4. Реплікація віроїдів

Геном віроїдів являє собою ковалентно замкнену в кільце одноланцюгову РНК. Ця РНК, на відміну від вірусів, не кодує ніяких білків, тому для віроїдів не можна віднести геномну або комплементарну їй РНК до (+) або (–) типу. Проте та РНК, яка є присутньою в клітині в найбільшій кількості, за угодою умовно названа (+) сенсова РНК, хоча така термінологія у випадку віроїдів є умовною і не має загальноприйнятого значення.

РНК віроїдів не входить до складу віріонів якого-небудь типу і завжди є голою. Коли ця РНК потрапляє в клітину, вона реплікується білками клітини-хазяїна. Ферментом, який здійснює реплікацію віроїдів, найімовірніше є ДНК-залежна РНК-полімераза. Залишається невідомим, яким чином цей фермент функціонує на РНК-матриці, але це може принаймні частково бути пов'язано із структурою генома віроїдів, значна частина якого має спарені нуклеотиди (мал. 4.31).

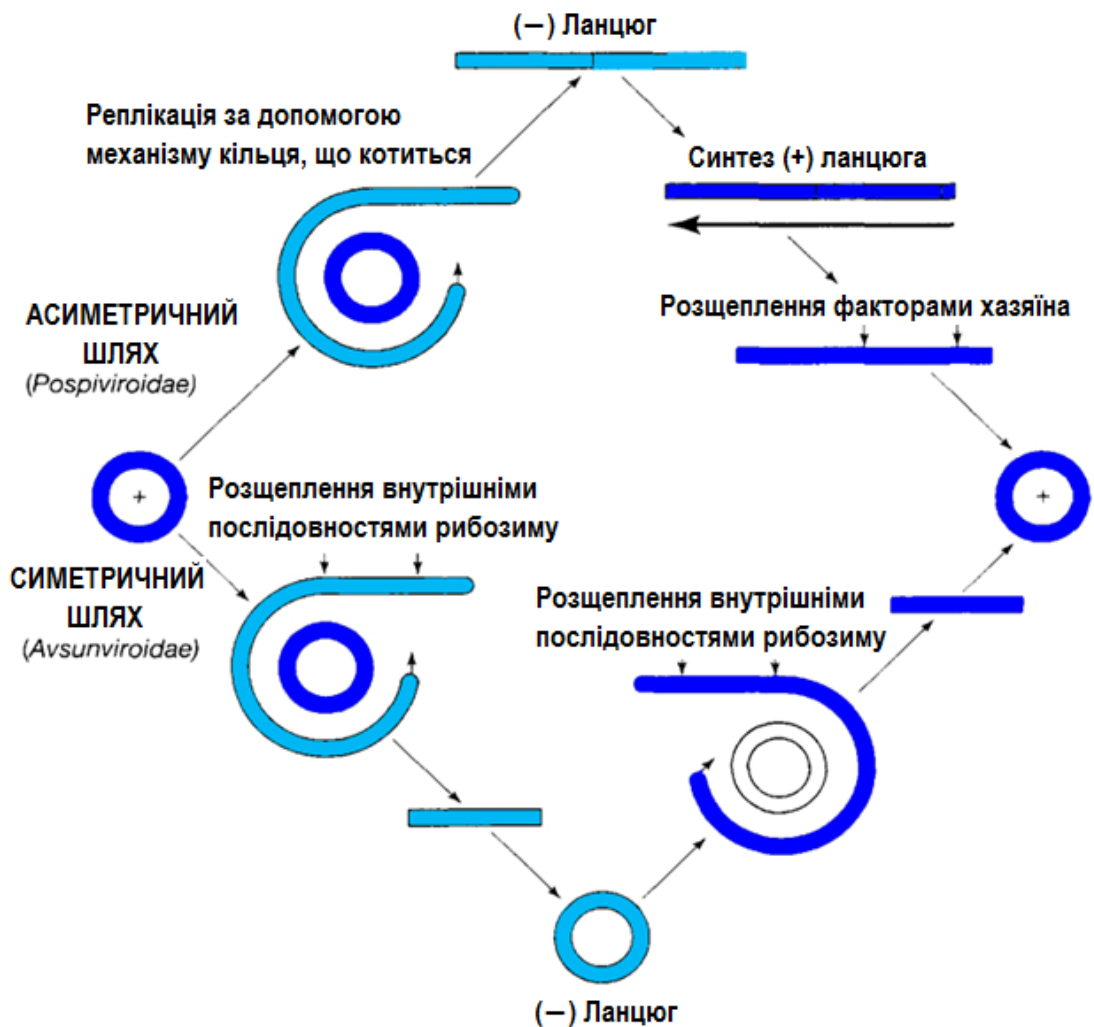


Мал. 4.31. Структура віроїда збудника веретеноподібності бульб картоплі. РНК віроїда складається з 359 нуклеотидів, близько 70% яких спарені з комплементарними нуклеотидами, завдяки чому віроїд у електронному мікроскопі має паличкоподібну форму.

Реплікація генома віроїдів, як вважають, виконується за участю механізму кільця, що котиться, аналогічно реплікації замкнутої в кільце ДНК (мал. 4.32).

РНК-полімераза II починає реплікацію в певній точці генома, хоча природа подій ініціації реплікації залишається невідомою. Процес реплікації призводить до синтезу лінійної конкатемерної РНК, комплементарної геномній РНК. Далі у представників сімейства *Avsunviroidae* ця РНК розрізається на молекули, що мають довжину геномної РНК. Розрізання виконується за участю незвичайної послідовності нуклеотидів наново синтезованої РНК, яка називається рибозимом. Рибозим автокаталітично розрізає РНК в специфічних ділянках, утворюючи лінійні одноланцюгові РНК, що мають розмір генома віроїда. Далі ці молекули замикаються в кільце. Залишається невідомим, яким чином відбувається утворення цього кільця. Потім, завдяки спаровуванню основ, формується паличкоподібна структура, подібна до структури початкової РНК. На матриці цього «мінус»-ланцюга за допомогою механізму колеса, що котиться, синтезується «плюс»-геномна РНК у вигляді конкатемера, яка потім розрізається рибозимом і утворені геноми замикаються в кільце.

У сімейства *Pospiviroidae*, представники якого не мають в геномі послідовностей рибозиму, спочатку механізмом кільця, що котиться, синтезується довгий «мінус» ланцюг, на якому у свою чергу синтезується лінійний «плюс» ланцюг, котрий потім невідомими факторами хазяїна розрізається на лінійні одноланцюгові РНК, які мають розмір генома. Далі ці РНК замикаються в кільце невідомим механізмом.



Мал. 4.32. Механізм реплікації віроїдів . Розрізняють два сімейства віроїдів: *Pospiviroidae* і *Avsunviroidae*. Представники сімейства *Pospiviroidae* не мають активності рибозиму і реплікуються в ядрі зараженої клітини так званим несиметричним шляхом, тоді як представники *Avsunviroidae* мають у складі генома послідовності рибозимів і реплікуються в хлоропластах симетричним шляхом.

4.4. Збирання (морфогенез) вірусних часток і вихід віріонів з клітини

Як було відмічено раніше, віріони є метастабільними. З одного боку, вони повинні являти собою стабільні структури, які зберігаються в навколишньому оточенні як інфекційні одиниці. З іншого боку, при зараженні клітини віріони повинні поводитися як нестабільні структури, щоб геном вірусу міг вивільнятися. Тобто, віріон повинен мати вбудований «перемикач», який зобов'язаний здійснювати перехід від стабільності до нестабільності, коли вірус опиняється у відповідному оточенні. «Пусковим сигналом», який викликає таке перемикач, може бути зв'язування віріона з рецептором на поверхні клітини і/або зміни в концентрації протонів або інших іонів.

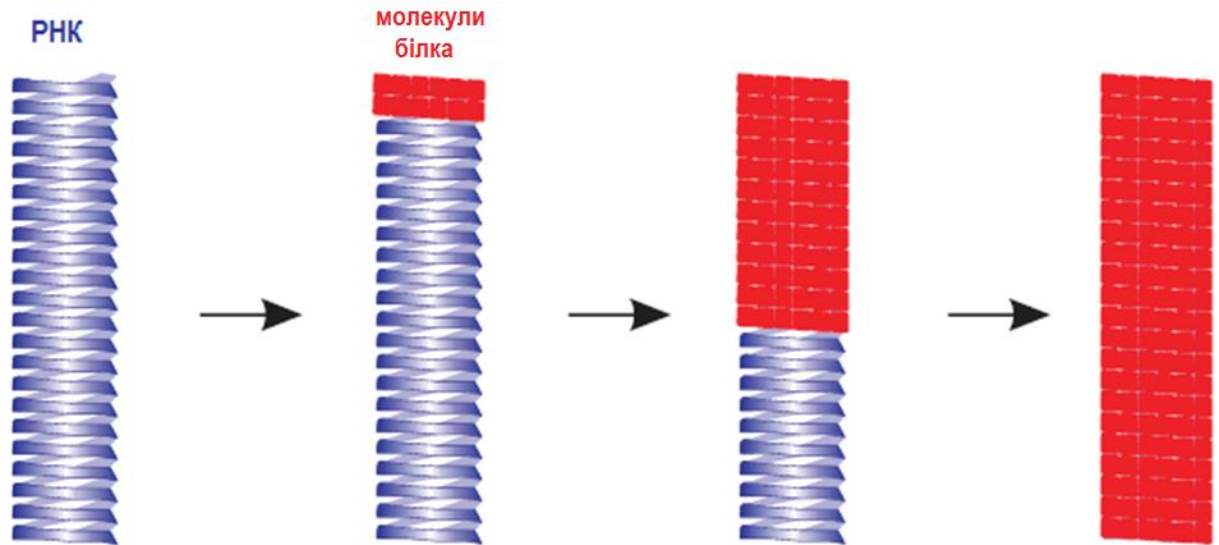
Після накопичення в інфікованій клітині певних порогових кількостей вірусних геномів і структурних білків, може початися збирання віріонів, яке називають також морфогенезом вірусів. Структурні компоненти збираються в нуклеокапсид. Якщо віріон містить ліпіди, то в процесі зборки додаються і ці компоненти, або як внутрішня мембрана, або як оболонка.

4.4.1. Збирання нуклеокапсидів

4.4.1.1. Віруси, що мають спіральну структуру

Збирання віріонів і нуклеокапсидів, що мають спіральну симетрію, включає утворення

оболонки генома з множинних копій білку (мал. 4.33).



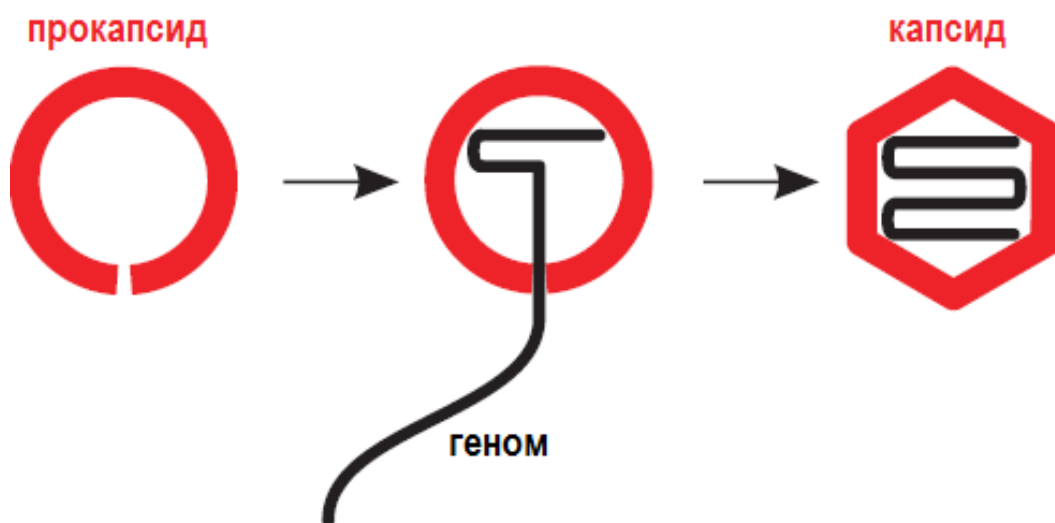
Мал. 4.33. Збирання нуклеокапсиду, що має спіральну структуру.

Процес розпочинається з прикріплення декількох молекул білку до одноланцюгової спіральної молекули РНК; далі приєднуються усі нові білкові субодиниці, поки РНК не виявиться повністю покритою білковою оболонкою.

4.4.1.2. Ікосаедричні віруси

Збирання віріонів і нуклеокапсидів багатьох вірусів, що мають ікосаедричну симетрію, включає утворення порожньої білкової оболонки, званої прокапсидом або проголовкою у випадку структури голівка-хвіст бактеріофага. Далі прокапсид заповнюється копією генома вірусу, і впродовж цього процесу або після нього він може зазнати модифікацію з формуванням зрілого капсиду. Модифікація прокапсиду може мати результатом зміну форми з сферичної на ікосаедричну. Для деяких вірусів також показано, що модифікація прокапсиду включає ферментативне розрізання одного або декількох структурних білків.

Геном входить в прокапсид через канал, розташований в ділянці, яка стане однією з вершин ікосаедра. У цій ділянці розташовані ті ферменти, які беруть участь в упаковці генома (мал. 4.34).



Мал. 4.34. Морфогенез нуклеокапсиду, що має ікосаедричну симетрію.

Проголовки багатьох фагів, що мають хвіст, також мають вхід, через який входить копія генома вірусу. Крім того, цей вхід служить свого роду конектором, що сполучає хвіст з голівкою.

Пакування генома

У контексті упаковки вірусного генома, ключове питання звучить так: як вірус вибирає свій геном з усіх нуклеїнових кислот клітини і вірусу? Наприклад, в клітинах, заражених ретровірусами, вірусний геном складає менш одного відсотка усіх РНК. Проте фактично ретровіруси упаковують ряд РНК клітини, включаючи тРНК, які грають ключову роль в реплікації вірусів. Деякі інші віруси також упаковують нуклеїнові кислоти клітини, наприклад фаги іноді пакують ДНК хазяїна. Проте основна частина клітинних нуклеїнових кислот не упаковується.

Яким чином вірусам вдається проявляти таку вибірковість? Для деяких вірусів показано, що це досягається за допомогою вірусних білків, що специфічно зв'язуються з послідовностями геномів вірусу, відомими як сигнал упаковки. У геномів, представлених одним ланцюгом, сигнал упаковки є ділянкою з певною вторинною структурою. Віруси з одноланцюговими геномами як правило упаковують або плюс-ланцюг, або мінус-ланцюг; таким чином цей сигнал має бути присутнім тільки у ланцюга, який має бути упакований.

Важливим є те, що деякі копії вірусного генома не повинні пакуватися, оскільки служать як матриці для синтезу РНК, ДНК або білків. У таких копій генома сигнал упаковки повинен якимсь чином маскуватися.

Геноми вірусів упаковуються в невеликі об'єми. Це означає, що відштовхування між негативно зарядженими фосфатними групами в їх геномах має бути здолане. Це може бути досягнутий розміщенням основних білків, що мають позитивний заряд, уздовж генома. У більшості випадків такі основні білки кодуються вірусами, проте папіломавіруси і поліомавіруси покривають свою ДНК гістонами клітини хазяїна.

Деякі віруси упаковують інші позитивно заряджені матеріали, такі як поліаміни і катіони.

Механізм зборки

В умовах лабораторії віріони можуть розбиратися на складові молекули. Для деяких вірусів інфекційні віріони можуть знову збиратися з очищених компонентів (білків і нуклеїнових кислот) за відповідних умов рН у присутності певних іонів. Віруси, які здатні до подібного самозбирання, мають відносно просто влаштовані віріони, що складаються з нуклеїнової кислоти і одного або двох видів білків. Віруси, які здатні до самозбирання в пробірці, як вважають, також зазнають самозбирання в зараженій клітині. Прикладом таких вірусів є вірус тютюнової мозаїки, що має спіральну симетрію, і бактеріофаги з одноланцюговою РНК, що мають ікосаедричну симетрію. Самозбирання є економним процесом, оскільки для морфогенезу не потрібно ніякої додаткової генетичної інформації.

Віріони вірусів, що мають складнішу структуру, типу герпесвірусів або бактеріофагів, що мають організацію голівка-хвіст, не можуть збиратися самі з очищених компонентів в пробірках. Для їх морфогенезу потрібні умови інфікованої клітини, і віріони будуються в процесі спрямованого збирання. Спрямоване збирання ікосаедричних вірусів може включати білки, які тимчасово є присутніми у віріоні при його побудові, але відсутні в зрілій частці. Ці білки відомі як каркасні білки (scaffolding proteins). Коли їх функція завершується, вони видаляються з прокапсиду. Деякі видаляються за допомогою протеолізу, інші залишаються інтактними і можуть бути використані повторно. Каркасні білки фагів, що мають хвіст, визначають розмір і форму голівки фага.

Деякі віруси кодувають поліпротеїни, з яких окремі вірусні білки вивільняються протеазами. Багато таких білків використовуються в процесі збирання. Пікорнавіруси і ретровіруси являють собою дві групи вірусів, які використовують таку стратегію. Остаточне розрізання поліпротеїну пікорнавірусів відбувається після того, як копія генома входить в прокапсид. Внутрішня структура віріона ретровірусу формується з продуктів розщеплювання поліпротеїну на пізній стадії процесу зборки.

4.4.2. Формування мембрани віріонів

Віріони, що мають оболонку, придбавають її за допомогою одного з двох механізмів: або вони модифікують мембрану клітини хазяїна і отримують оболонку брунькуванням через неї, або вірус безпосередньо ініціює синтез нової мембрани навколо нуклеокапсиду.

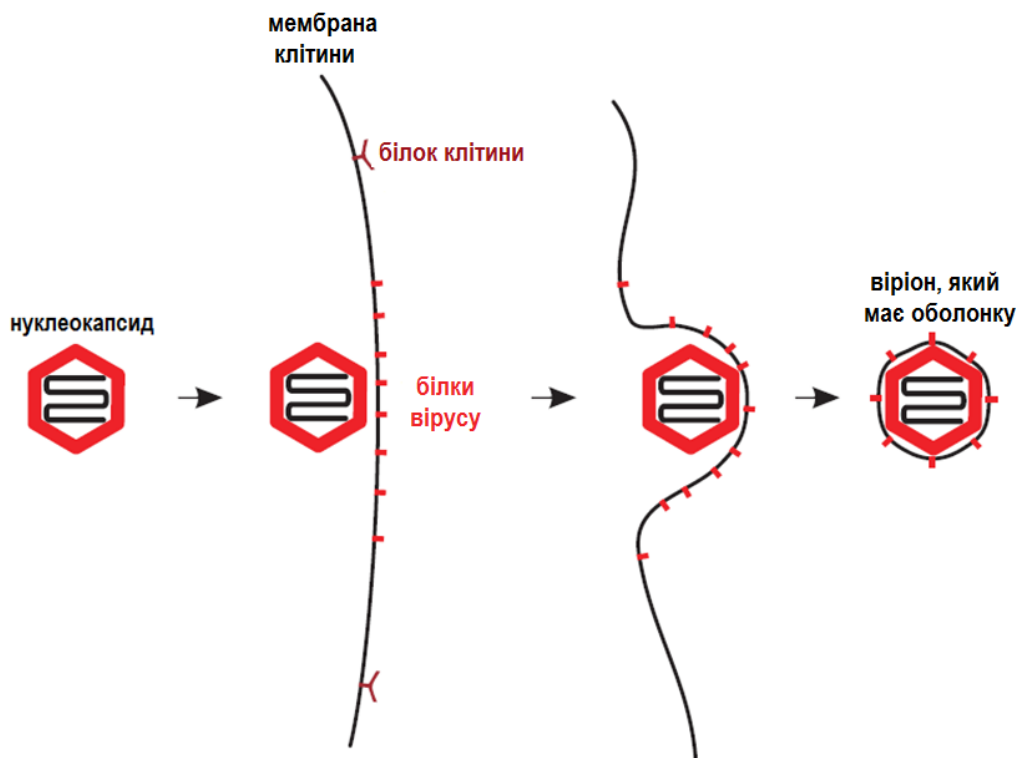
4.4.2.1. Брунькування через мембрани клітини

Більшість оточених оболонкою вірусів придбавають оболонку за допомогою брунькування через мембрани клітини-хазяїна (мал. 4.35).

У вірусів, хазяями яких є клітини еукаріот, ця мембрана часто є плазматичною мембраною. Регіон мембрани, через який брунькується вірус, модифікується за допомогою вбудовування одного або декількох видів білків вірусу, більшість яких є глікопротеїнами. Зазвичай інтегральні білки в ліпідному бішарі мають певну міру мобільності, оскільки вони «плавають в морі» ліпідів. Проте в тих ділянках мембран, де накопичуються вірусні білки, білки клітини-хазяїна витісняються. Вірусні білки або якимсь чином відштовхують білки клітини, або вірусні білки мають високу спорідненість один до одного. Білки клітини можуть не повністю витіснятися з цих ділянок мембрани, і тоді вони включаються в оболонку вірусу, наприклад оболонка ВІІ має білки класу II головного комплексу гістосумісності. Нуклеокапсиди, які повинні отримати оболонку брунькуванням, накопичуються у безпосередній близькості від ділянок мембрани, що містять білки вірусу.

Брунькування віріонів включає взаємодію між цитоплазматичними ділянками вірусного глікопротеїну в мембрані і іншим білком вірусу. У низки груп вірусів між нуклеокапсидом і оболонкою є шар білку М (мембрана, матрикс). Білки М мають спорідненість до мембрани, і зв'язують нуклеокапсид і глікопротеїни вірусів, «зшиваючи» їх впродовж брунькування. Роль, подібну білку М, грає білок М1 вірусу грипу А, і домен МА (матрикс) білку Gag ретровірусів.

Не усі віруси з оболонкою мають шар білку між оболонкою і нуклеокапсидом. У альфа-вірусів (до яких належить, наприклад, вірус жовтої лихоманки), поверхня нуклеокапсиду безпосередньо взаємодіє з цитоплазматичними ділянками глікопротеїнів мембрани.



Мал. 4.35. Придбання оболонки віріоном через брунькування. Вірусні мембранні білки, зазвичай глікопротеїни, вбудовуються в ділянку мембрани. Нуклеокапсид розмножується брунькуванням через мембрану, яка потім відшнуровується і формує оболонку.

Віруси, що брунькуються на плазматичній мембрані, брунькуються на певній ділянці плазматичної мембрани, і якщо клітина поляризована, брунькування відбувається переважно на одній поверхні. Поверхні тіла, такі як дихальні шляхи, покриті клітинами епітелію, які є поляризованими. Кожна клітина має апікальну (зовнішню) і базолатеральну (внутрішню) поверхні, і багато вірусів переважно брунькуються на одній з цих поверхонь. Вірус грипу А брунькується майже виключно на апікальній поверхні, тоді як вірус везикулярного стоматиту брунькується виключно через базолатеральну поверхню. У експериментах, в яких гени білків оболонки цих вірусів експресували в клітинах, показали, що кожен білок має сигнал, який його направляє до поверхні, через яку брунькується відповідний вірус.

На завершальній стадії брунькування відбувається відшнуровування мембрани і вивільнення віріонів, що наново сформувалися. Є дані, які вказують на те, що білки клітини зв'язуються з білками вірусу і відіграють важливу роль в цьому процесі.

Деякі віруси, що мають оболонку, брунькуються не на цитоплазматичній мембрані, а на інших мембранах клітини. Нуклеокапсид вірусу герпесу формується в ядрі, і починає свій шлях в цитоплазму за допомогою брунькування через внутрішню мембрану ядерної оболонки. Зрілий же віріон отримує оболонку в цитоплазмі за допомогою брунькування через мембрану везикул, що мають походження від комплексу Гольджі. Гепаднавіруси брунькуються через мембрану між ендоплазматичним ретикуломом і комплексом Гольджі.

Один з небагатьох бактеріофагів, що мають оболонку, вірус L2 *Acholeplasma laidlawii*, набуває оболонку за допомогою брунькування через клітинну мембрану свого хазяїна-мікоплазми.

4.4.2.2. Синтез вірусної мембрани *de novo*

Меншість вірусів, що мають оболонку, самі направляють синтез ліпідної мембрани на

пізній стадії циклу реплікації. В деяких випадках мембрана формує оболонку віріона (наприклад у поксвірусів), в інших випадках мембрана формує шар нижче поверхні капсиду (наприклад у іридовірусів).

Бакуловіруси, які уражують безхребетних тварин, утворюють два типи оболонки віріона впродовж реплікації. Один тип віріонів задіяний в поширенні інфекції до інших клітин хазяїна, і віріони придбавають оболонку за допомогою брунькування через плазматичну мембрану. Інший тип віріонів призначений для зараження нового особини хазяїна. Оболонка таких віріонів закладається навкруги нуклеокапсидів усередині ядер клітини, і віріони виявляються вбудованими в так звані тільця включення.

Серед вірусів прокаріот, фаг ф6 придбаває свою оболонку в цитоплазмі. Ліпіди мають походження від мембрани клітини хазяїна, і віріони вивільняються за допомогою лізису клітин. Віріон фага РМ2 не має зовнішньої оболонки, але має мембрану між зовнішньою і внутрішньою білковими оболонками. Мембрана синтезується в зараженій клітині.

4.4.3. Вихід віріонів з інфікованої клітини

Віріони багатьох вірусів покидають інфіковану клітину, коли вона лізується (лопається). Цей процес може бути ініційований вірусом. Багато фагів продукують ферменти, які розривають зв'язки у пептидоглюкані клітинної стінки бактерій. Інші фаги продукують білки, які інгібують ферменти хазяїна, необхідні для синтезу клітинної стінки; усе це призводить до послаблення клітинної стінки і, врешті-решт, до лізису. Загальний вихід віріонів на одну заражену клітину значно варіює. Загальний вихід фага Т4 складає 200 віріонів, тоді як вихід пікорнавірусів може досягати 100000.

Багато вірусів не викликають лізису клітин своїх хазяїв; дочірні віріони можуть вивільнятися з клітини впродовж певного періоду часу. Віріони багатьох вірусів відшнуровуються від плазматичної мембрани, не призводячи до її руйнування. Віріони, які придбають оболонку на внутрішніх мембранах клітини, покидають клітину іншими шляхами. Деякі транспортуються до поверхні клітини у везикулах, які зливаються з плазматичною мембраною і вивільняють віріони. Інші прикріплюються до моторних білків мікротрубочок і досягають поверхні клітини, через яку потім вивільняються.

Нитчасті фаги є вірусами без оболонки з унікальним механізмом для виходу з клітин своїх бактерій-хазяїв: виштовхування через поверхню клітин. Одноланцюгова ДНК такого фага укрита білком усередині клітини. Проте як тільки фаг виштовхується з клітини, він втрачає цей білок і придбаває капсид.

Після виходу з клітини, більшість віріонів залишаються інертними доти, поки не проникнуть в нову клітину. Проте є декілька випадків, коли віріони зазнають морфологічні зміни після виходу з клітини, оскільки їх дозрівання триває після виходу з клітини. Наприклад, у віріонах ретровірусів розрізання поліпротеїну починається в ході брунькування і завершується, коли віріон вже покинув клітину. Іншим прикладом є бактеріофаг археї *Acidianus convivator*, що має незвичайну лимоноподібну форму. Два довгі хвости у цього фага розвиваються після виходу з клітини-хазяїна.

Віруси рослин мають відмінний спосіб передавання, і фітопатогенні віруси покидають клітини рослин інакше, ніж віруси тварин і бактерій. Клітини рослин відокремлені одна від одної товстими клітинними стінками, які пронизані плазмодесмами. Віруси здатні поширюватися по рослині через плазмодесми. Для передавання на нового хазяїна, віруси рослин покидають попереднього хазяїна у вигляді їжі векторів (наприклад попелюх або нематод), які живляться вмістом уражених клітин.

4.4.4. Дефектні вірусні частки. Помилки при упаковці вірусів

При взаємодії вірусу з клітиною можуть утворюватися не лише зрілі інфекційні частки, але і так звані дефектні віруси або вірусні частки з дефектним геномом.

Дефектний геном — це будь-який вірусний геном, в якому один або декілька генів втратили функцію, необхідну для автономної реплікації вірусу, у зв'язку з чим для реплікації потрібна допомога іншого вірусного генома або гена. Виділяють 5 класів дефектних вірусних геномів, які зберегли свою біологічну активність :

1. Дефектні геноми, залежні від вірусу-помічника.
2. Дефектні геноми, інтегровані в хромосому клітини хазяїна.
3. Псевдовіріони.
4. Умовно-дефектні геноми.
5. Віруси-сателіти.

4.4.4.1. Дефектні геноми, залежні від вірусу-помічника.

У цей клас входять так звані дефектні інтерферуючі частки, — ДІ-частки. Вони є делеційними мутантами, що втратили істотну частину генома батьківського вірусу. Делеція може досягати 90% генома, хоча виявлені делеції, що зачіпають лише 1% генома. Для відновлення втрачених функцій ДІ-частці потрібне одночасне зараження спорідненим вірусом-помічником. При цьому, ДІ-частки пригнічують (інтерферують) реплікацію вірусу-помічника, використовуючи з цією метою продукти його власних генів.

ДІ-частки утворюються при реплікації будь-якого вірусу, відрізняються розміром від нормального віріона і мають різну ступінь інтерференції. Наприклад, ДІ-частки поліовірусу інтерферують слабо, а ДІ-частки вірусу везикулярного стоматиту — сильно. Дефектні віруси, що інтерферують, як очевидно, є спорідненими вірусу-помічникові (фактично вони є дефектним варіантом цього вірусу).

4.4.4.2. Дефектні геноми, інтегровані в хромосому клітини хазяїна.

Факт інтеграції генома низки вірусів в геном клітини хазяїна нині не викликає сумніву. Проте інтегрувати можуть не лише повні, але і дефектні геноми, особливо в клітинах бактерій. Як правило, це дефектні гени, що «мовчать». У певних умовах вони можуть бути індуковані (активація, запуск реплікації) і їх експресія може впливати на виживаність і еволюцію клітини хазяїна. При індукції таких геномів вірусів бактерій за допомогою мітоміцину або ультрафіолету можна спостерігати утворення фрагментів вірусу: порожніх голівок, хвостових відростків, повних голівок без відростків. Індуковані частки фагів можуть викликати загибель чутливих до вірусу штамів бактерій. Також як і нормальні інтегровані геноми, інтегровані дефектні геноми можуть інактивувати гени клітини-хазяїна або сприяти їх експресії, надавати нові генетичні властивості, вводити, усувати або сприяти їх експресії, усувати або переміщати регуляторні елементи, а також сприяти рекомбінаційним змінам ДНК клітини хазяїна.

4.4.4.3. Псевдовіріони

Це вірусні частки, що містять замість геномної нуклеїнової кислоти вірусу, нуклеїнову кислоту клітини хазяїна. У прокаріот утворення таких псевдовірусів має величезне генетичне значення і є механізмом переміщення генетичного матеріалу хазяїна з однієї клітини в іншу. У еукаріот генетичне значення псевдовіріонів не встановлене, але їх утворення показано. Наприклад, при інфікуванні вірусом поліоми велика частка потомства, що утворюється, є псевдовіріонами.

4.4.4.4. Умовно-дефектні геноми

Це мутантні геноми, дефектні тільки в певних умовах, наприклад ts-мутанти (температуро-чутливі мутанти); hr-мутанти (мутанти по спектру хазяїв) тощо.

4.4.4.5. Особливості репродукції вірусів-сателітів

Віруси-сателіти – це віруси, які паразитують на генних продуктах, утворених іншими, неспорідненими вірусами. Віруси-сателіти поширені серед вірусів рослин. Віруси-сателіти можуть так само, як ДІ-частки, інтерферувати з вірусом-помічником, проте, на відміну від ДІ-часток, виникнення вірусів-сателітів не пов'язане з делецією генів вірусу-помічника. Дуже часто РНК- чи ДНК-геном вірусу-помічника не має гомології з геномом вірусу-паразита. Вірус-сателіт у своїй реплікації повністю залежить від одночасного зараження клітини хазяїна вірусом-помічником. Прикладами вірусів-сателітів є:

1. STNV — сателіт вірусу некрозу тютюну, помічник — вірус некрозу тютюну.
2. Сателіт–коліфаг р4, помічник — коліфаг р2.
3. AAV — аденоасоційовані віруси, помічник — аденовіруси.
4. Дельта–сателіт, помічник — вірус гепатиту В.

Сателіти мають особливості, що відрізняють їх від «звичайних» вірусів. Сателіти підрозділяють на дві форми, віруси-сателіти і сателітні нуклеїнові кислоти (котрі інколи називають вірусоїдами). Ні віруси-сателіти, ні сателітні нуклеїнові кислоти не кодують ферментів, необхідних для їх реплікації. Для своєї репродукції вони повинні заражати клітину спільно із звичайним вірусом, так званим вірусом-помічником або хелперним вірусом, який і надає усі необхідні ферменти. Геном вірусів-сателітів значно відрізняється від генома вірусу-помічника, тобто сателіт не є просто дефектним варіантом помічника. Віруси-сателіти кодують структурні білки, які формують їх капсид, проте сателітні вірусні кислоти кодують тільки неструктурні білки або не кодують ніяких білків взагалі. Сателітні нуклеїнові кислоти отримують свої структурні білки від вірусу-помічника.

З деякими обмовками, сателіти можна назвати паразитами вірусів!

Присутність вірусів-сателітів або сателітних нуклеїнових кислот може впливати на реплікацію вірусу-помічника і може посилювати або послабляти тяжкість захворювання, що викликається вірусом-помічником.

Геноми вірусів-сателітів і сателітних нуклеїнових кислот невеликі за розміром і можуть бути представленими ДНК або РНК. ДНК може бути одноланцюговою або дволанцюговою. РНК в геномах сателітів може бути лінійною одноланцюговою, кільцевою одноланцюговою або дволанцюговою.

Більшість вірусів-сателітів асоційована з вірусами рослин, проте є віруси-сателіти бактеріофагів і віруси-сателіти вірусів тварин.

Прикладом важливого стосовно здоров'я людини вірусу-сателіта є вірус гепатиту D (дельта). Вірус дельта знайдений тільки в асоціації з вірусом гепатиту В, і у присутності вірусу дельта патогенність вірусу гепатиту В збільшується. Геном вірусу гепатиту дельта являє собою кільцеву одноланцюгову (–)РНК. Вірус гепатиту дельта не здатний реплікуватися без вірусу-помічника, тобто без вірусу гепатиту В. Вірус-помічник забезпечує сателіта структурними білками, які укладають геном в капсид і дозволяють сателіту поширюватися.

Додаткове читання до глави 4

1. Скулачев М.В. Внутренняя инициация трансляции – разнообразие механизмов и возможная роль в жизнедеятельности клетки // Успехи биол. химии.– 2005. –Т. 45.– С. 123—172.
2. Beck J., Nassal M. Hepatitis B virus replication // World J. Gastroenterol.– 2007.– V. 13, №1.– P.48–64.

3. Crick F.H. On protein synthesis // Symp. Soc. Exp. Biol.-1958.-V.12.-P.138-163.
4. den Boon J.A., Diaz A., Ahlquist P. Cytoplasmic viral replication complexes // Cell Host Microbe.- 2010.-V.8№1.-P.77-85.
5. Marsh M., Helenius A. Virus entry: open sesame // Cell.-2006.-V.124,№4.- P. 729-740.
6. Mercer J., Schelhaas M., Helenius A. Virus entry by endocytosis // Annu. Rev. Biochem.- 2010.- V.79.- P. 803-833.
7. Novoa R.R., Calderita G., Arranz R., Fontana J., Granzow H., Risco C. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis.- Biol. Cell.-2005.- V.97, №2.-P. 147-172.
8. Smith A.E., Helenius A. How viruses enter animal cells // Science.- 2004.-V. 304, №5668. - P. 237-242.
9. Tsai B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. -2007.- V.23.-P. 23-43.

Глава 5. Розповсюдження вірусів

Деяка мінімальна кількість віріонів, які були сформовані у зараженого хазяїна, мають бути перенесені на нових хазяїв, в яких утворюються нові віріони. Якщо цього не відбуватиметься, вірус зникне. Єдиною альтернативною можливістю для виживання генів вірусу є його збереження в клітинах у вигляді нуклеїнової кислоти, яка реплікується і передається дочірнім клітинам при діленні.

Віруси бактерій і інших мікроорганізмів вивільняються із заражених клітин в середовище, що оточує хазяїна, де ймовірно можуть бути присутніми інші сприйнятливі клітини. Ці віруси залежать від шансу зустрітися із сприйнятною клітиною, до якої вони можуть приєднатися через поверхневі рецептори і проникнути всередину.

Віруси багатоклітинних організмів також повинні знайти нову клітину для зараження. Інфекція може поширюватися до клітин, що примикають, або до клітин, що знаходяться на деякому видаленні від зараженої, за допомогою перенесення вірусних часток кров'ю у тварин або по флоемі рослин. Проте зрештою для свого виживання вірус повинен знайти нового хазяїна.

Деякі віруси після зараження міняють поведінку своїх хазяїв, збільшуючи вірогідність свого поширення. Ссавці, заражені вірусом сказу, часто стають агресивними; така зміна поведінки збільшує вірогідність укусу хазяїном вірусу іншого індивідуума і передачі вірусу через слину. Деякі личинки комах, що живляться на рослинах, після зараження бакуловірусами стають більш рухливими, допомагаючи вірусу поширюватися.

При їх міграціях між хазяями віруси повинні виживати в несприятливих умовах оточення, таких як повітря, вода або ґрунт. Проте низка вірусів може переміщатися на нових хазяїв без попадання у недружнє оточення. Це віруси, які можуть переноситися безпосередньо від хазяїна до хазяїна, наприклад при поцілунках, а також віруси, які переносяться за допомогою переносників, або векторів. До подібних вірусів відносяться також віруси, які можуть передаватися від батьків потомству, наприклад насінням рослин.

Передача вірусів потомству при різних способах розмноження зветься **вертикальною** передачею вірусів. Усі інші випадки передачі вірусів називають **горизонтальною** передачею.

Поширення вірусів в людській популяції має свої особливості. Відповідно до чотирьох основних типів локалізації збудника в організмі (дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт, кров, зовнішні покриви) виділені декілька механізмів передачі вірусів.

Трансмісивний механізм — передача за допомогою біологічних переносників. При будь-якому варіанті такої передачі вірус черпається переносником з внутрішнього середовища донора і впроваджується у внутрішнє середовище реципієнта.

Парентеральний механізм — передача вірусів через кров. Віруси, циркулюючи в крові, можуть передаватися в процесі переливання крові, при використанні забруднених шприців і інших медичних інструментів (штучний шлях), в процесі сексуальних контактів (статевий шлях) і іншими шляхами.

Аліментарний (ентеральний) механізм — вірус проникає через слизові оболонки органів травлення. Різновидом аліментарного механізму є фекально-оральний механізм передачі вірусу.

Аерогенний механізм — входними воротами інфекції є слизові оболонки органів дихання. Реалізується повітряно-краплинним або пиловим шляхом.

Контактний механізм — реалізується через шкірні покриви. Такий механізм передачі

можуть використати дуже небагато вірусів. Так, наприклад, вірус сказу може проникати в організм тварини і людини при облизюванні шкірних покривів. Слина собак містить гіалуронідазу, яка полегшує проникнення вірусу в кров через шкіру.

Вертикальний механізм — передача вірусів від матері плоду під час виношування і пологів. Збудник може передаватися через плаценту, через навколоплідні води і оболонки, при проходженні плоду через пологові шляхи матері.

Різними способами віруси можуть переміщатися на значні відстані. У нові області віруси можуть переноситися вітром або водою. Наприклад, спалах ящура на острові Вайт в протоці Ла-Манш в 1981 році були ініційовані вірусом, який був перенесений по повітрю з Бретані, що знаходиться на відстані більше 250 км. Віруси птахів, риб, людей і інших хазяїв переміщуються усередині своїх хазяїв в інші частини планети в результаті міграції, подорожей або експорту тварин. Наприклад, завдяки міграції птахів переноситься вірус пташиного грипу, завдяки подорожам людей переноситься вірус атипової пневмонії, завдяки експорту тварин переноситься вірус віспи мавп.

Більше того, віруси можуть транспортуватися і на неживих матеріалах, наприклад вірус ящура на соломі і сільськогосподарських машинах і навіть на взутті людей.

Теоретично єдиний віріон може викликати зараження, але практично виявляється, що хазяїн має бути інокульований деякою мінімальною кількістю віріонів, щоб зараження сталося. Мінімальна кількість вірусних часток, необхідна для зараження хазяїна, зветься **мінімальною інфікуючою дозою**.

5.1. Загальні принципи передачі вірусів за допомогою векторів

Багато вірусів тварин і рослин переносяться між хазяями за допомогою організмів, які живляться на цих хазяях. Є декілька аспектів стосовно векторного перенесення, загальні для вірусів тварин і рослин.

Багато векторів вірусів є членистоногими, або артроподами (комахи, кліщі). Тому віруси хребетних, які переносяться членистоногими, часто називають арбовірусами (від *arthropod-borne viruses*).

Правилом векторного перенесення є те, що вектор придбаває вірус, коли він живиться на зараженому хазяїнові, і надалі переносить вірус на одного або декількох нових хазяїв. Деякі віруси переносяться після того, як віріони прикріплюються до ротового апарату їх векторів в результаті живлення. Передача вірусів у такому разі може здійснюватися впродовж секунд або хвилин після того, як вектор придбав вірус. Проте багато вірусів, що переносяться векторами, проходять через стінки травного тракту вектору і потрапляють в його кровоносну систему. Далі вірус потрапляє в слинні залози і виділяється із слиною, заражаючи нового хазяїна при живленні вектору. Такий спосіб передання вірусів називають циркулятивним, і передача вірусу вектором може відбуватися тільки через годинни або навіть дні після того, як він придбав вірус.

Деякі циркулятивні віруси реплікуються в одній або декількох тканинах і органах свого вектору; таким чином, є віруси, які можуть реплікуватися як у безхребетних тваринах, так і в рослинах, або як у безхребетних, так і в хребетних тваринах.

Таким чином, є віруси з вражаюче широким колом хазяїв. Більшість, але не усі, безхребетних векторів мало страждають від присутності вірусу або взагалі не відчують шкоди від зараження. При зараженні вірусом репродуктивних органів, стає можливою передача вірусу від вектору до вектору. Деякі віруси передаються при спаровуванні від самців до

самиць і навпаки, інші віруси передаються наступному поколінню через яйця. У разі передачі через яйця, це явище називають **трансоваріальною** передачею вірусу.

Між більшістю векторів і вірусами, які вони переносять, є висока ступінь специфічності. У загальному випадку специфічність більше виражена між вірусами рослин і їх векторами при порівнянні з вірусами хребетних і їх векторами.

5.2. Передача вірусів рослин

Клітина рослини оточена товстою клітинною стінкою, яка є істотним бар'єром для вірусу. Більшість вірусів рослин долають цю перешкоду за допомогою векторів. Рослину в якості джерела їжі використовує широке коло організмів, і деякі з цих організмів, особливо безхребетні, можуть бути векторами (переносниками) для вірусів (мал. 5.1).

Багато векторів (наприклад попелихи, нематоди) живляться, проколюючи клітинні стінки і всмоктуючи вміст, тоді як жуки найчастіше бувають такими, що гризуть тканини рослин. Найбільш загальним вектором вірусів рослин є попелиці.



Попелиці

Цикадки

Білокрилки

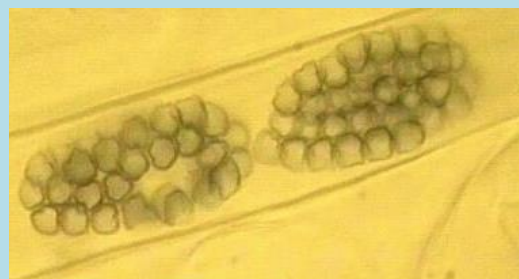
Жуки



Кліщі



Нематоди



Фітопатогенні протисти

Мал. 5.1. Приклади векторів, які спроможні передавати віруси рослин.

Може виникнути питання, яким чином безхребетні, які живляться, всмоктуючи вміст клітини рослини, можуть ввести вірус в клітину, в якій він зможе реплікуватися. Відповідь на це питання полягає в тому, що вектор промацує низку клітин перед тим, як вибере одну для живлення. Тому вірус потрапляє в клітини, які були випробувані, але не занадто пошкоджені вектором.

Фітопатогенні нематоди, що переносять віруси, є тваринами, які проколюють клітини коренів і живляться їх вмістом. Передача вірусу нематодою припиняється після линьки. Це вказує на те, що вірус не проникає з травного тракту в тіло нематоди.

Деякі фітопатогенні грибоподібні організми, які належать до протистів, також можуть бути векторами вірусів. Наприклад *Spongospora subterranea*, яка викликає порошисту паршу картоплі, є вектором, що переносить вірус моп-топ картоплі (potato mop top virus). Протист *Polymyxa betae* переносить вірус некротичного пожовтіння жилок буряка, який

викликає хворобу, відому як ризоманія. Якщо рослина заражена вірусом і переносником-протистом, віріони можуть переміститися до спори переносника. Вірус може виживати в спорах впродовж місяців і років, поки спори не проростуть і не заразять нового хазяїна, який стає зараженим і фітопатогенним протистом, і вірусом.

Близько 20% вірусів рослин можуть передаватися вертикально, завдяки чому заражени стає насіння, яке при проростанні дає заражене покоління рослин. Більшість вірусів, які передаються насінням, розташовуються у зародку, який придбаває віруси або із зараженої яйцеклітини, або із заражених пилкових зерен. Багато вірусів рослин можуть бути передані штучним шляхом, наприклад при щепленнях заражений вірусами матеріал може бути перенесений на нового хазяїна.

5.3. Передача вірусів хребетних

5.3.1. Невекторна передача вірусів хребетних

Багато вірусів хребетних тварин, включаючи людину, заражають своїх хазяїв через слизові оболонки верхніх дихальних шляхів. Заражена особина може розповсюджувати крапельки, що містять вірус, при чханні, розмові або кашлі, і новий хазяїн стає зараженим при вдиханні цього матеріалу. Віруси, що заражають шлунково-кишковий тракт, можуть виводитися з екскрементами, і якщо екскременти потраплять у воду або в їжу, то після споживання такої води або їжі новий хазяїн може заразитися вірусом.

Деякі віруси можуть вивільнятися при ушкодженнях (наприклад віруси ящура при ушкодженні на кінцівках або у роті), папіломавіруси вивільняються у бородавках, а віруси простого герпесу з уражень на губах. Ці віруси можуть бути перенесені при безпосередньому контакті зараженого і незараженого хазяїв, або вони також можуть бути передано опосередковано через забруднення навколишніх предметів.

У більшості схожих випадків хазяїн стає зараженим, коли заражаються епітеліальні клітини і/або лімфоїдні клітини на поверхні тіла. При деяких інфекціях, наприклад при вірусній застуді, зараження обмежується цими тканинами. У інших же випадках (наприклад вірус кору або ВІЛ) вірус перетинає епітеліальні тканини і поширюється до інших тканин і органів.

5.3.2. Векторна передача вірусів хребетних

Вектори, які переносять віруси хребетних, найчастіше є членистоногими, що живляться кров'ю, які придбавають віруси, коли живляться на зараженій тварині. Очевидно, що це відбувається тільки тоді, коли вірус є присутнім в крові зараженої тварини; таку ситуацію в медицині називають вірусемією.

Приклади переносників, за допомогою яких передаються віруси хребетних тварин, наведені на мал. 5.2. Так, комарі можуть бути переносниками таких вірусів, як вірус жовтої лихоманки або вірус лихоманки Західного Нілу. Мошки здатні передавати вірус-збудник катаральної лихоманки овець (блутангу). Багато вірусних хвороб передаються кліщами; до них зокрема належить кліщовий енцефаліт.

Деякі членистоногі, які придбавають вірусну інфекцію у хребетних, залишаються інфекційними усе життя. Це відбувається у випадку кліщів, які заражаються вірусом кліщового енцефаліту. Трансоваріальна передача показана для низки вірусів, включаючи вірус жовтої лихоманки, який переноситься комарами.



Комарі



Мошки



Кліщі



Нестерильні шприци

Мал. 5.2. Приклади векторів, які спроможні передавати віруси хребетних тварин.

Віруси, що містяться в крові або продуктах переробки крові, можуть бути перенесені впродовж медичних процедур неживими «векторами», типу устаткування для переливання крові або шприців.

5.4. Передача вірусів безхребетних тварин

Вище йшлося про віруси рослин і хребетних тварин, які можуть реплікуватися у векторах – безхребетних тваринах. Проте на ці віруси можна дивитися і з точки зору переносників і вважати їх вірусами безхребетних, оскільки безхребетні тварини є для них також є хазяями. Однак окрім цих вірусів, безхребетні тварини мають багато власних вірусів, які реплікуються тільки у безхребетних тваринах. Багато хто з цих вірусів формує білкові включення, які є великими білковими структурами, в які включені віруси. До вірусів, які утворюють включення, належать зокрема і бакуловіруси. Включення можуть виводиться з фекаліями інфікованої вірусами комахи, або залишаються в хазяїнові, поки комаха не буде з'їдена хижаком або доки вони не загинуть в результаті вірусної інфекції. Включення є досить міцними структурами, які здатні пережити розкладання хазяїна і забезпечують захист віріонів в зовнішньому оточенні. Нові комахи стають інфікованими, коли ковтають включення з їжею. Ферменти і високий рН в кишечнику руйнують тельця включення, вивільняючи віріони.

Для деяких безхребетних тварин повідомляють про вертикальну передачу і векторну передачу вірусів. Вертикальна передача може здійснюватися через яйця, тобто трансволярно, або через поверхню яєць. До векторів, що беруть участь в передачі вірусів між комахами, належать паразитичні оси.

5.5. Пермісивні клітини

Для своєї реплікації, віруси повинні отримати доступ до пермісивних⁶ клітин, тобто сприйнятливих до вірусу клітин хазяїна, здатних забезпечити реплікацію вірусів. Для вірусів, які зв'язуються з поверхневими рецепторами клітини, першим кроком в зараженні є пошук відповідного рецептора, з яким вірус може зв'язатися. Окрім того, клітина повинна або містити усі необхідні вірусу компоненти, або вірус їх має бути здатний індукувати. До таких компонентів належать зокрема клітинні білки, такі як фактори транскрипції і ферменти.

Деякі віруси обмежені вузьким кругом пермісивних клітин, наприклад віруси гепатиту В майже виключно обмежені гепатоцитами. Інші віруси менш обмежені в типі клітин, і багато хто може розмножуватися навіть в цілковито неспоріднених хазяях, наприклад в рослині і комасі-переноснику вірусу.

Деякі віруси еукаріот потребують, щоб клітина хазяїна була в певній фазі клітинного циклу. Наприклад, ретровірусам необхідно потрапити в ядро клітини, і більшість з них можуть це зробити тільки тоді, коли оболонка ядра руйнується під час мітозу. Парвовіруси містять ДНК, і для реплікації своєї ДНК використовують ферменти хазяїна. Відповідно, їм потрібні клітини, в яких ці ферменти є присутніми, тобто клітини у фазі S.

Наступною важливою вимогою до пермісивних клітин є відсутність у них захисту від вірусу, або вірус має бути здатним здолати захист клітини.

Таким чином, для успішного зараження клітини вірус повинен доставити в неї свій геном, геном повинен залишитися інтактним і вірус повинен покласти край усім спробам хазяїна припинити його реплікацію.

Додаткове читання до глави 5.

1. Bergelson J.M. Virus interactions with mucosal surfaces: alternative receptors, alternative pathways // *Curr. Opin. Microbiol.* –2003.– V.6, №4.–P.386–391.
2. Gray S.M, Banerjee N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*– 1999.– V.63, №1.–P.128–148.
3. Ng J.C., Perry K.L. Transmission of plant viruses by aphid vectors // *Mol. Plant Pathol.* – 2004.– V.5, №5.–P.505–511.
4. Ng J.C., Falk B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006.– V.44.– P.183–212.
5. Lundström J.O. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review // *J. Vector Ecol.* – 1999.– V.24, №1.–P.1–39.
6. Pereira L., Maidji E., McDonagh S., Tabata T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface // *Trends Microbiol.* 2005 Apr;13(4):164-74.
7. Pirone T.P. Helper-dependent vector transmission of plant viruses // *Annu. Rev. Phytopathol.*– 1996.–V.34.–P. 227–247.
8. Taylor C.E., Brown D.J.F. Nematode vectors of plant viruses. Wallingford: CAB International, 1997.– 286 pp.

⁶ Пермісивний – від англ. permissive – який дозволяє, терпимий, поблажливий.

Глава 6. Наслідки зараження вірусом хазяїна

У главі 4 були обговорені аспекти циклу реплікації вірусів, який починається зараженням клітини і кульмінацією якого є вихід потомства вірусу з інфікованої клітини. Коли вірусна інфекція призводить до такого результату, вона називається **продуктивною** (від лат. *productivus* – розтяжний, плідний) (мал. 6.1). Віріони вивільняються, коли клітина хазяїна зазнає лізис або клітина може залишитися живою і вивільняти віріони впродовж певного періоду, який може бути коротким, як у випадку ВІЛ, або тривалим, як у випадку гепатиту В.



Мал. 6.1. Можливі наслідки взаємодії вірусу з клітиною.

В деяких випадках результат вірусної інфекції не є продуктивним. Цьому може бути декілька причин.

- Інфекція може стати **латентною** (від лат. *latentis* – прихований, невидимий), з геномом вірусу, що зберігається впродовж усього життя клітини-хазяїна і можливо навіть передається дочірнім клітинам при діленні.

- Інфекція може бути **абортивною** (від лат. *abortivus* – передчасний, недоношений), при якій не встановлюється ані продуктивна, ані латентна інфекція. Абортівна інфекція може спостерігатися при зараженні вірусом клітин, які нездатні підтримувати його реплікацію. Одним з випадків абортівної інфекції є зараження клітини дефектним вірусом з геномом, що мутував. Такий вірус не здатний пройти в клітині повний цикл реплікації.

- Внаслідок активації антивірусного захисту, в зараженій клітині може бути індукована програмована загибель клітини (апоптоз), що, вочевидь, не дозволить вірусу завершити цикл реплікації.

Деякі віруси зберігаються в своїх хазяях впродовж тривалого часу, іноді усе життя. Таку вірусну інфекцію називають **персистентною** (лат. *persisto* – постійно перебувати, уперто триматися). В окремих випадках персистентна інфекція є продуктивною, наприклад при зараженні ВІЛ; у інших випадках персистенція вірусу може набувати форми латентності, що змінюється формою продуктивності, як відбувається у випадку зараженнями вірусами

герпесу. Тривале зараження деякими вірусами може призвести до розвитку ракової пухлини у хазяїна.

Деякі бактеріофаги, включаючи нитчасті фаги, ініціюють персистентну продуктивну інфекцію клітин їх бактерій-хазяїв. За сприятливих умов, клітини бактерій залишаються живими впродовж тривалого часу, виділяючи віріони.

Наслідок зараження вірусом з точки зору хазяїна може варіювати від нешкідливості на одному кінці шкали, через хвороботворну дію різного ступеня до загибелі хазяїна на іншому кінці шкали. Наслідок вірусної інфекції залежить від взаємодії різноманіття особливостей хазяїна, самого вірусу і чинників середовища.

В ході еволюції у організму, який є хазяїном для вірусу, розвивається антивірусний захист. Проте вірус також міняє свою тактику нападу. Взаємодія між вірусом і його хазяїном часто є тим, що називають гонкою озброєнь, і вірус виробляє свої контрзаходи проти захисту хазяїна.

6.1. Чинники, що впливають на результат вірусної інфекції

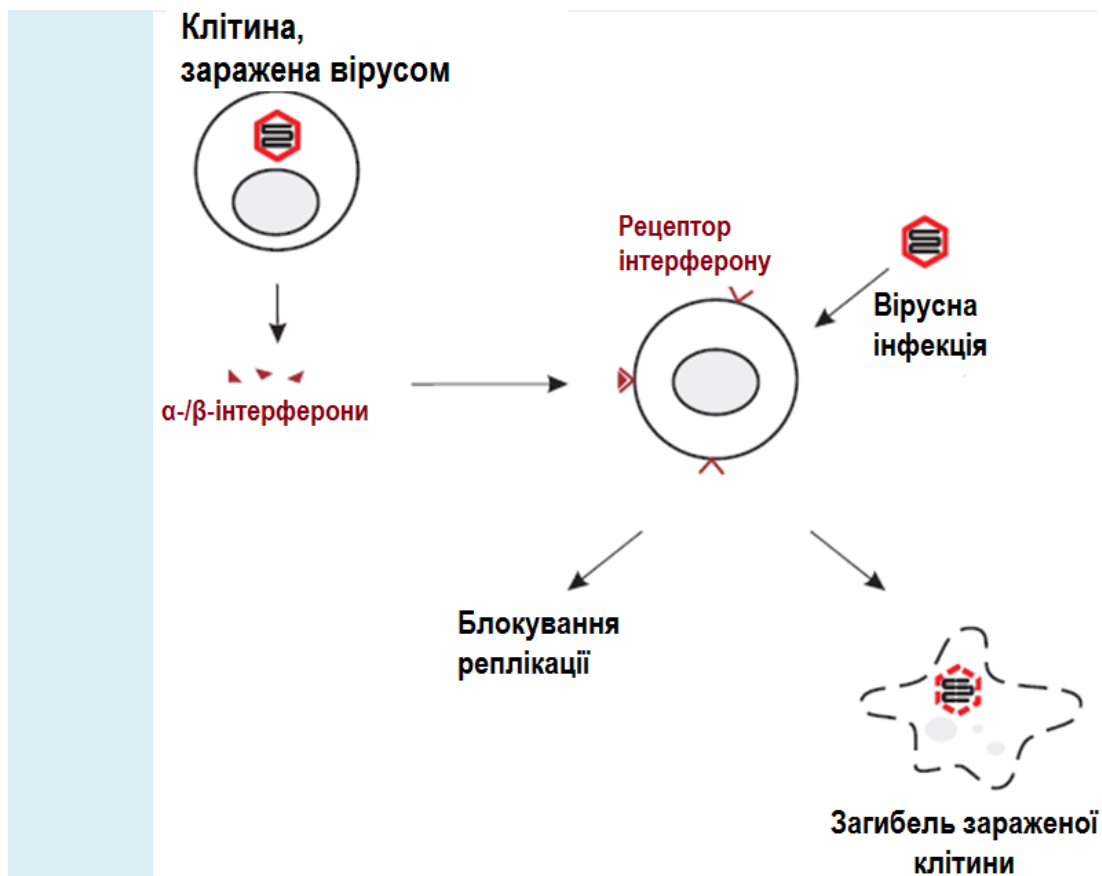
Основним чинником, що зачіпає результат зараження вірусами хребетних тварин, є ефективність імунної системи хазяїна. У тварин це стосується як природженого імунітету, так і адаптивного або набутого імунітету.

6.1.1. Природжений імунітет хребетних тварин

6.1.1.1. Інтерферони

Інтерферони є білками, які синтезуються і виділяються клітинами у відповідь на зараження вірусами. Потужним стимулом для синтезу інтерферону є дволанцюгова РНК, яка утворюється при реплікації РНК-геномних вірусів.

Роль інтерферонів полягає в захисті прилеглих клітин від зараження і активації обумовленого Т-клітинами імунітету. Є декілька типів інтерферонів, і альфа- і бета- (α - і β -) інтерферони синтезуються більшістю типів клітин при зараженні їх вірусами (мал. 6.2). Після виділення клітинами, що продукують їх, молекули інтерферону дифундують до сусідніх клітин, де вони запускають різні антивірусні реакції за допомогою зв'язування з рецепторами інтерферону.



Мал. 6.2. Активності α - і β -інтерферонів.

До антивірусних реакцій, що запускаються α - і β -інтерферонами, належать такі.

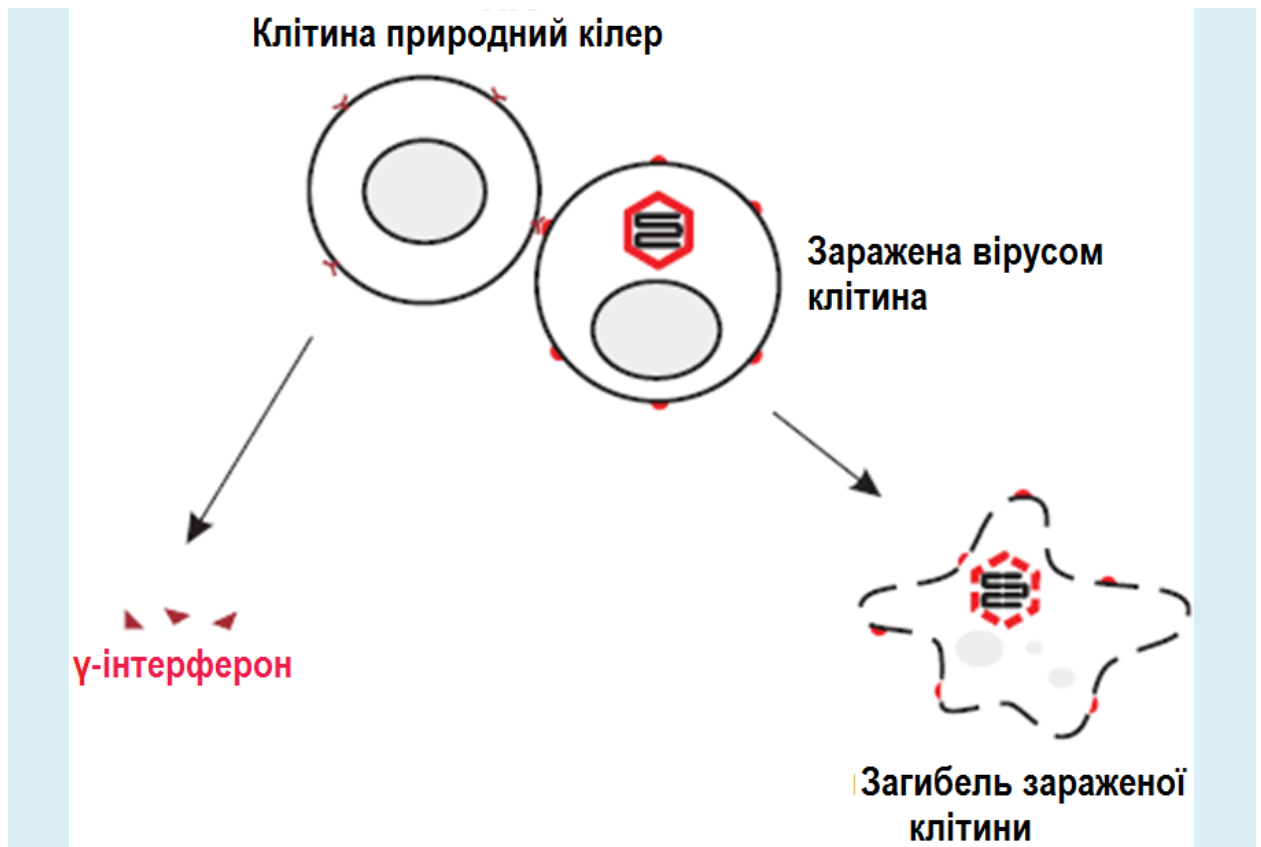
- Активація генів, які кодують антивірусні білки, такі як залежна від дволанцюгової РНК протеїнкіназа R і РНКаза L.
- Стимуляція утворення молекул головного комплексу гістосумісності класу I і білків протеосом; ці молекули посилюють презентацію вірусних пептидів на поверхні заражених клітин Т-клітинам.
- Активація клітин природних кілерів.
- Індукція запрограмованої загибелі клітини, апоптозу.

Ще один тип інтерферону, гамма- (γ -) інтерферон, продукується в основному Т-клітинами і клітинами природних кілерів, як реакція на різні молекули, що виділяються при імунній відповіді. Гамма-інтерферон викликає ряд ефектів, включаючи стимуляцію презентації антигена і активацію фагоцитів і клітин природних кілерів.

Протидія вірусів дії інтерферонів. Багато вірусів продукують білки, які інгібують або синтез інтерферонів, або їх активність. Наприклад, білок NS1 вірусу грипу А і білок NS3-4A вірусу гепатиту В блокують метаболічні шляхи, що беруть участь в синтезі інтерферону. Інші віруси, такі як поліовірус, запобігають синтезу інтерферону загальним блокуванням експресії генів клітини.

6.1.1.2. Клітини природні кілери

Клітини природні кілери присутніми по усьому організму, але головним чином зустрічаються в крові. Вони є окремим класом лімфоцитів, мають цитотоксичну дію проти пухлинних клітин і клітин, заражених вірусами. Природні кілери є одним з найважливіших компонентів клітинного природженого імунітету.



Мал. 6.3. Активність клітин природних кілерів.

Природні кілери розпізнають зміни поверхневих молекул заражених вірусом клітин, які відбуваються в результаті зараження. На відміну від В- і Т-клітин, вони не розпізнають специфічні антигени. Після розпізнавання зараженої вірусом клітини як своєї мішені, природні кілери приєднуються до клітини і вбивають її.

Природні кілери вбивають клітину або виділяючи перфоріни, білки, які вбудовуються в мембрану зараженої вірусом клітини, утворюючи в ній отвори, що приводить до загибелі, або індують апоптоз. Також, після прикріплення до зараженої клітини, природні кілери виділяють γ -інтерферон.

Протидія вірусів природним кілерам. Прикладом є ВІЛ, присутність часток якого в крові змінює експресію низки молекул на поверхні клітин природних кілерів. Це знижує активність природних кілерів, включаючи їх здатність вбивати інфіковані вірусами клітини і виділяти γ -інтерферон.

6.1.1.3. Білки APOBEC3

Білки APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 proteins) є ферментами в клітинах людини і тварин, які втручаються в процес реплікації ретровірусів. Ці ферменти можуть індукувати летальні мутації за допомогою дезамінування дезоксицитидину, перетворюючи його на дезоксиуридин, в процесі зворотної транскрипції. Декілька з цих білків в клітинах людини можуть втручатися в реплікацію ВІЛ. Два з них, APOBEC3F і APOBEC3G, можуть включатися у віріони ВІЛ і поглинатися разом з вірусною часткою іншими клітинами, в яких вони повністю порушують реплікацію вірусу на стадії зворотної транскрипції.

Протидія вірусів білкам APOBEC3. У цитоплазмі заражених ВІЛ клітин білок вірусу Vif зв'язується з APOBEC3G, запускаючи його деградацію і запобігаючи включенню у віріон вірусу.

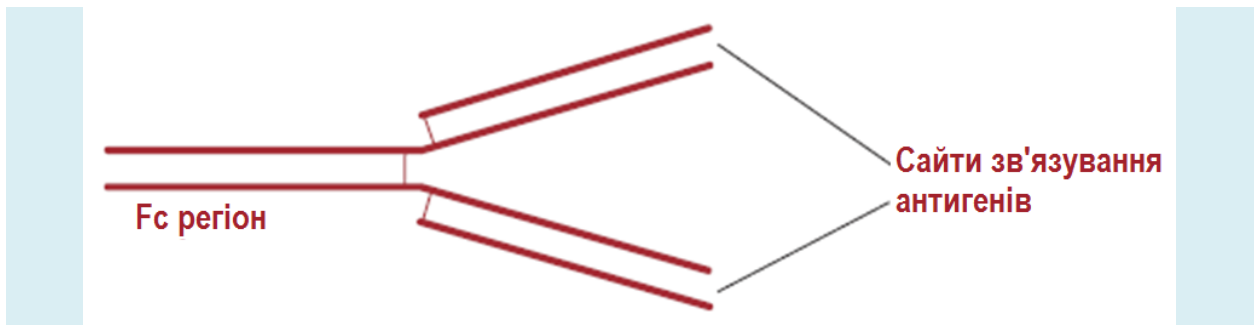
6.1.2. Адаптивний (придбаного) імунітет хребетних тварин

Важливим наслідком зараження вірусом хребетних тварин є специфічна імунна відповідь, що запускається антигенами вірусу. Регіон антигена, що зветься епітопом, зв'язується із специфічним рецептором лімфоцита, активуючи каскад подій, які призводить до імунної відповіді.

Ключовими учасниками специфічної імунної відповіді є лімфоцити. Є два класи лімфоцитів: В-лімфоцити (В-клітини), які розвиваються у фабрицієвій сумці птахів і кістковому мозку ссавців, і Т-лімфоцити (Т-клітини), які розвиваються у тимусі (вилочковій залозі). Кожен лімфоцит є специфічним для окремого епітопа завдяки присутності специфічного рецептора епітопа на поверхні клітини. Так звані наївні, або ненавчені лімфоцити ще не зустрілися зі своїм специфічним епітопом і мають поверхневі молекули і характер циркуляції в тілі, що відрізняються від лімфоцитів, які раніше зустріли свій епітоп.

Антитіла

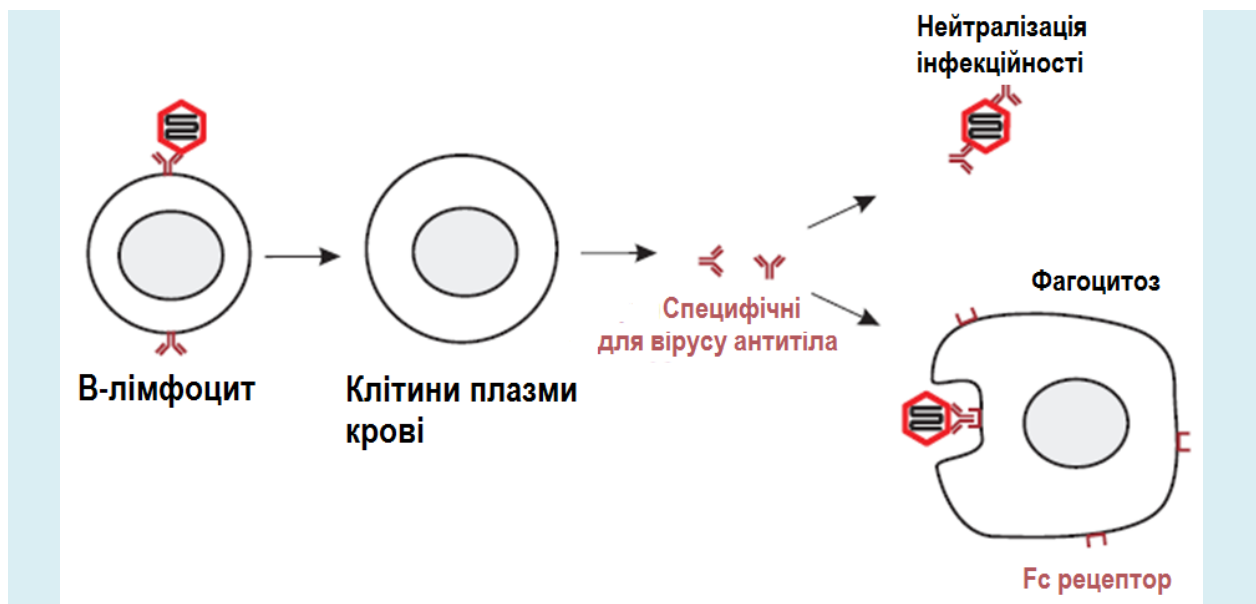
Антитіла є глікопротеїнами, що належать до типу білків, які зветься імуноглобулінами (Ig). Молекули антитіл складаються з двох «важких» і двох «легких» поліпептидних ланцюгів (мал. 6.4), містять два сайти зв'язування антигенів і регіон, відомий як Fc. Є декілька класів імуноглобулінів, щодо противірусного імунітету найбільш важливими є IgG і IgM в крові і IgA на слизових оболонках. У нормі молекули IgG є мономерами, IgA димерами, а IgM пентамерами.



Мал. 6.4. Структура молекули антитіла. Молекула складається з чотирьох поліпептидів – двох «важких» і двох «легких» ланцюгів, сполучених разом дисульфідними зв'язками. Організація цих поліпептидів створює структуру, що має дві ділянки, які можуть зв'язуватися із специфічними антигенами. Fc – фрагмент, що кристалізується (Fragment crystallizable).

Специфічні для певного антигена антитіла синтезуються клітинами плазми крові, які беруть походження від В-лімфоцитів. Проліферація певного клону В-клітин стимулюється взаємодією антигена і специфічного рецептора на поверхні клітини.

Антитіла відіграють важливу роль в декількох аспектах антивірусного імунітету (мал. 6.5). Специфічні для вірусу антитіла здатні покрити як віріони, так і заражені вірусами клітини, і це може привести до їх деструкції різними способами.



Мал. 6.5. Деякі аспекти протівірусної активності антитіл. Антитіла можуть зв'язатися з віріоном і нейтралізувати його інфекційність. Покритий антитілами віріон може бути поглинений фагоцитом після прикріплення Fc-регіонів антитіл до рецепторів на фагоциті.

Декілька типів клітин імунної системи має рецептори для Fc-регіону IgG, що дозволяє цим клітинам прикріплюватися до покритих антитілами віріонів або заражених клітин. До типів клітин, що мають рецептори для Fc-регіону, належать нейтрофіли і макрофаги, а також клітини природні кілери. Нейтрофіли і макрофаги є фагоцитами і можуть поглинати покритий антитілами матеріал; проте вони можуть вбивати покриті антитілами клітини без їх поглинання. Клітини природні кілери можуть вбивати інфіковані вірусами клітини або інтегруючи перфोरини в мембрани таких клітин, або індукуючи в них апоптоз.

Ще одним наслідком зв'язування антитіл з вірусними антигенами є активація комплементу. Система комплементу — комплекс білків, постійно присутніх в крові. Це каскадна система протеолітичних ферментів, призначена для захисту організму від дії сторонніх агентів, вона бере участь в реалізації імунної відповіді організму і є важливим компонентом як природженого, так і адаптивного імунітету.

Білки комплементу у присутності певних вірусів зазнають модифікацій, які допомагають захистити хазяїна від інфекції. Одним з антивірусних ефектів є включення комплексів білків комплементу в мембрани віріонів, що мають оболонки, і мембрани клітин, заражених вірусом. Це призводить до деструкції як віріонів, так і заражених клітин. Ще одним антивірусним ефектом білків комплементу є їх здатність покривати віріони. Рецептори білків комплементу є у деяких типів нейтрофілів і макрофагів, які поглинають віріони.

Зв'язування антитіл з віріонами може призводити також до нейтралізації інфекційності. Це може відбуватися різними механізмами. Так, антитіла можуть вивільняти нуклеїнову кислоту з віріона. У дослідженнях з деякими вірусами було показано, що антитіла можуть приєднуватися до віріона, а потім від'єднувати від нього, залишаючи порожній капсид, позбавлений генома. Далі, антитіла можуть запобігати прикріпленню віріона до рецепторів на поверхні клітини, маскуючи сайти прикріплення у віріона (антирецептори). Антитіла можуть також призводити до від'єднання від клітини віріонів, що вже прикріпилися. Нарешті, антитіла можуть інгібувати роздгання генома.

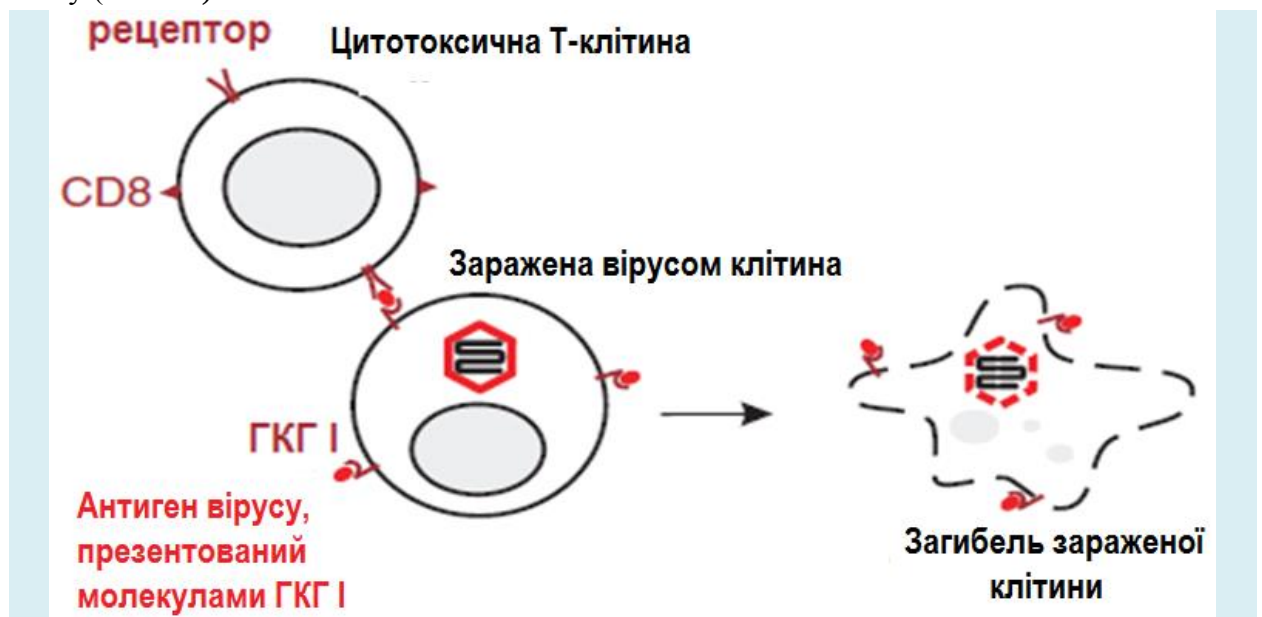
Т-лімфоцити

Через декілька днів після стимуляції антигенами, наївні (ненавчені) Т-клітини розвиваються в ефекторні Т-клітини, які підрозділяють на два класи.

- Хелперні Т-клітини виділяють специфічні цитокіни⁷. Особливістю Т-хелперних клітин є присутність молекул білка CD4 на їх поверхні. Т-хелперні клітини грають ключову роль в ініціації імунної відповіді, виконуючи багато функцій.

- Цитотоксичні Т-клітини вбивають заражені вірусами клітини. Для них є особливістю присутність на поверхні білка CD8. Антиген вірусу має бути презентованим (виставленим) на поверхні клітини-мішені. Антиген може бути білком поверхні віріона, хоча часто антигенами є внутрішні білки віріона і навіть неструктурні білки.

Вірусні антигени виставляються на поверхні клітин в асоціації з молекулами головного комплексу гістосумісності класу I. Ще говорять, що молекули ГКГ класу I презентують антиген цитотоксичним Т-лімфоцитам. Цитотоксичні Т-клітини вбивають клітини-мішені за допомогою вбудовування в їх мембрани білків (перфоринів) або за допомогою індукції апоптозу (мал.6.6).



Мал. 6.6. Загибель зараженої вірусом клітини, що індукується цитотоксичною Т-клітиною. Цитотоксична Т-клітина вбиває заражену вірусом клітину після того, як рецептори Т-клітини розпізнають фрагмент вірусного антигена, виставлений на поверхні клітини в асоціації з молекулами головного комплексу гістосумісності класу I (ГКГ I).

Протидія вірусів Т-клітинам. Деякі віруси, такі як віруси герпесу, знижують рівень експресії молекул головного комплексу гістосумісності класу I на поверхні клітини, що робить проблематичним для Т-клітин розпізнавання клітин-мішеней.

Імунологічна пам'ять

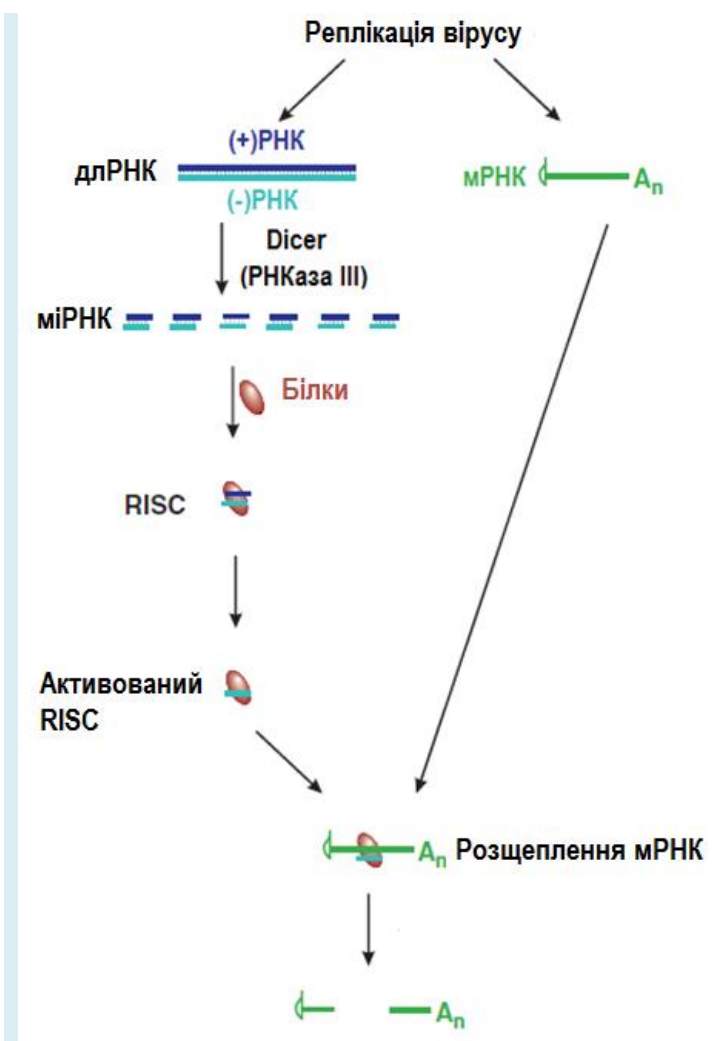
Якість і інтенсивність адаптивного імунітету залежить від того, чи зустрічається хазяїн з цим вірусом перший раз. Деякі В- і Т-лімфоцити можуть виживати впродовж тривалого

⁷ Цитокіни — клас невеликих пептидів та білків (8–30 кДа), що регулюють міжклітинні і міжсистемні взаємодії в організмі, включаючи виживання клітин, стимуляцію або пригнічення їх росту, диференціацію, функціональну активність і апоптоз, а також забезпечують узгодженість дії імунної, ендокринної і нервової систем в нормальних умовах і у відповідь на патологічні дії, включаючи появу інфекційних агентів. До цитокінів належать зокрема інтерферони.

часу як клітини імунологічної пам'яті після того, як організм був зараженим вірусом. Клітини пам'яті переходять в стан, що покоїться, з якого вони можуть бути реактивовані, якщо в організмі знову з'являється відповідний антиген. Ці клітини є основою імунологічної пам'яті, яка може формуватися або в результаті природної інфекції, або за допомогою антигенів вакцини. Таким чином, результат зараження хребетної тварини вірусом багато в чому залежить від того, має або ні хазяїн імунологічну пам'ять до антигенів цього вірусу. У разі наявності імунологічної пам'яті, захворювання зазвичай протікає легко або відсутнє взагалі.

6.1.3. Сайленсінг РНК

Сайленсінг («глушення») РНК (RNA silencing), також відоме як пост-транскрипційне глушення генів або інтерференція РНК, є внутрішньоклітинним процесом, який індукується дволанцюговою РНК. В результаті цього процесу руйнується матрична РНК, яка має таку ж послідовність нуклеотидів, як і ініціаторна длРНК. В результаті цього процесу руйнуються як мРНК вірусу, так і мРНК клітини (мал. 6.7).



Мал. 6.7. Сайленсінг РНК. Дволанцюгова РНК розрізається РНКазой Dicer на міРНК, які зв'язуються з білками RISC. Активований комплекс RISC містить фрагменти мінус-ланцюга РНК, які направляють комплекс на специфічну мРНК. мРНК розщеплюється білками RISC.

У цьому процесі дволанцюгова РНК розпізнається комплексом білків, до складу якого входить фермент, який дістав назву Dicer (від англ. dicer – машина для нарізання у формі кубиків). Цей фермент належить до сімейства РНКаз III і проявляє специфічність до дволанцюгової РНК, розрізаючи її на фрагменти довжиною 20–25 пар нуклеотидів. Ці фрагменти називають малі інтерферуючі РНК (міРНК). Фрагмент міРНК з'єднується з певними білками цитоплазми, формуючі комплексу RISC (RNA-induced silencing complex). У цьому комплексі дволанцюгова міРНК розплітається, і (–) ланцюг залишається в комплексі, що

активує цей комплекс. Мінус-ланцюг РНК в комплексі націлюється на мРНК на ділянку, що має комплементарні нуклеотиди, і далі в цьому регіону мРНК руйнується.

Сайленсінг РНК виявлено у рослин, грибів, хребетних і безхребетних тварин. У рослин він є важливим антивірусним механізмом; у грибів і тварин ймовірно також. Слід зазначити, що окрім захисту від вірусів, сайленсінг РНК також бере участь у регуляції експресії власних генів організму, зокрема у процесі ембріогенезу.

Протидія вірусів сайленсінгу РНК. Деякі віруси рослин кодують білки, які тим або іншим способом пригнічують цей процес.

6.1.4. Програмована загибель клітин, або апоптоз

Вірусна інфекція в клітинах може ініціювати процес, який призводить до загибелі клітини ще до того, як утворюється потомство вірусу. Таким чином, забезпечується запобігання поширення вірусу в інші клітини. У клітинах тварин цей механізм суїциду називають апоптозом. У рослин таку захисну реакцію називають реакцією надчутливості. Цей процес відіграє важливу роль не лише в імунологічній реакції, але також і в процесах нормального росту і розвитку.

Подібний механізм захисту від зараження фагами зустрічається і у бактерій. Загибель зараженої клітини до того, як потомство фага буде сформовано, захищає інші сприйнятливі клітини від зараження. Цей механізм був виявлений у *Escherichia coli* і багатьох інших видів бактерій.

Загалом, якщо заражена вірусом клітина успішно здійснить процес програмованої загибелі, то це виявиться корисним для усього багатоклітинного хазяїна або для популяції одноклітинних хазяїв.

Протидія вірусів апоптозу. У багатьох вірусів розвилися механізми, які можуть пригнічувати апоптоз в різних фазах цього процесу. Наприклад, багато ДНК-вірусів кодують білки, споріднені білкам клітини BCL-2, які контролюють перебіг апоптозу. Внаслідок блокування апоптозу клітина залишається живою і вірус завершує цикл реплікації.

6.2. Непродуктивна інфекція

При деяких обставинах вірус заражає клітину, але цикл реплікації вірусу не завершується, незважаючи на те, що клітина залишається живою. Якщо геном вірусу зберігається в клітині, таку інфекцію називають латентною. Інакше інфекцію називають абортивною.

6.2.1. Латентна інфекція

При латентній інфекції геном вірусу зберігається в клітині, або у вигляді послідовності ДНК, інтегрованої в геном, або у вигляді множинних копій ковалентно замкнутої кільцевої ДНК.

У клітинах еукаріот віруси пов'язані з гістонами клітини хазяїна, що є важливим для збереження латентного стану. Якщо умови усередині клітини стають сприятливими для реплікації, латентна інфекція може перетворитися на продуктивну інфекцію.

Явище латентної вірусної інфекції у бактерій носить назву лізогенії, а фаги, які можуть викликати латентну інфекцію, називають помірними фагами. Геноми фагів (профаги) можуть виживати так само, як і у випадку латентної інфекції у еукаріот. Часто профаг інтегрується у бактерійний геном, проте багато фагів виживають як кільцеві автономні ДНК.

Геном помірних фагів може містити гени, які створюють селективну перевагу бактерійним хазяям. Деякі фактори вірулентності паразитичних бактерій насправді кодуються помірними фагами, наприклад деякі штами *E. coli* стають здатними викликати дизентерію завдяки утворенню так званого шига-токсина, утворення якого контролюється помірним фагом.

Впродовж латентної інфекції геном вірусу може бути або повністю вимкнений, або деякі гени вірусу можуть експресуватися у вигляді білків і/або РНК, що не кодують білків.

У багатьох випадках латентна інфекція переходить в продуктивну інфекцію, цей процес називають індукцією. Індукція може відбуватися з різних причин:

- Клітина еукаріотичного хазяїна переходить в іншу фазу клітинного циклу.
- Клітина хазяїна опромінюється ультрафіолетовим випромінюванням. Це може запустити, наприклад, реплікацію помірного фага і лізис клітини бактерії-хазяїна, або латентний вірус простого герпесу переходить до реплікації і викликає герпес, лихоманку.
- В організмі хазяїна послаблюється імунітет. Це є іншою причиною, яка реактивує латентний вірус простого герпесу.
- Клітина хазяїна заражається іншим вірусом, який забезпечує функцію, яку перший вірус втратив. Це стосується вірусів-сателітів і вірусів-помічників.

6.2.2. Абортивна інфекція

При абортивній інфекції відсутня реплікація вірусу, і його геном не зберігається в клітині, як при латентній інфекції. Інфекція може бути абортивною з причин, пов'язаних з клітиною, навколишніми умовами і/або вірусом. Вірус може, наприклад, викликати продуктивну інфекцію в клітинах одного типу, але абортивну інфекцію в клітинах іншого типу. При деяких абортивних інфекціях вірус вбиває клітину хазяїна за рахунок занадто сильного пригнічення її метаболізму.

Деякі віріони містять дефектний геном, який може бути здатний ініціювати цикл реплікації, але не мати повного набору функціональних генів для його завершення.

6.3. Продуктивна інфекція

Продуктивна вірусна інфекція означає успішне завершення циклу реплікації вірусів і вивільнення дочірніх віріонів з заражених клітин, які можуть протягом цього процесу деякий час можуть залишатися живими або гинуть.

6.3.1. Поширення вірусів усередині організму багатоклітинного хазяїна

Після зараження першої клітини дочірні віріони можуть заразити сусідні клітини; наприклад віруси, що викликають застуду можуть заразити інші клітини епітелію, а ротавіруси інші клітини епітелію шлунково-кишкового тракту. Більшість розташованих поруч клітин тварин відокремлена одна від одної плазматичною мембраною, що дозволяє вірусам безпосередньо переходити з клітини в клітину.

Віруси рослин повинні переміщатися з клітини в клітину через плазмодесми, і кожен фітопатогенний вірус кодує від одного до чотирьох спеціалізованих білків, які дозволяють вірусу це робити. Ці білки зветься транспортними білками (ТБ) і функціонують з використанням різних механізмів. ТБ формують комплекси або з вірусною нуклеїновою кислотою, або з вірусною нуклеїновою кислотою і білком оболонки (нуклеокапсидом), допомагаючи їм переміщуватися через плазмодесми. Транспортні білки є поліфункціональними і грають роль не лише транспортного білку, але задіяні і в інших етапах циклу реплікації вірусу.

У деяких обставинах віріони можуть транспортуватися у віддалені частини хазяїна, де

сприйнятливі клітини стають зараженими. В якості пристосувань для транспорту, в тілі тварин можуть функціонувати кров і нерви, тоді як у рослин транспорт на далекі відстані здійснюється через флоему.

6.3.2. Захворювання

Багато вірусних інфекцій не викликають захворювання у своїх хазяїв, в інших же випадках вірус може викликати захворювання з фатальним результатом, таке як сказ або СНІД. Між двома цими крайніми випадками розташовані вірусні захворювання з різним ступенем тяжкості протікання.

Захворювання можна визначити по симптомах або певних ознаках. У медичній термінології симптоми є суб'єктивними особливостями, такими як біль в животі або відчуття втоми. Кажучи іншими словами, симптоми – це відчуття, які зазнає людина. Ознаки ж є об'єктивними особливостями, такими як, наприклад, кров у екскрементах або висипання на шкірі. Симптоми і ознаки хвороби – це не синоніми, не слід їх плутати. Симптоми може виявити тільки заражений індивідум, тоді як ознаки видно кожному. Фітопатологи і вірусологи, працюючи з рослинами, часто використовують термін симптоми відносно об'єктивних особливостей, таких як, наприклад, розмір поразок на листі або райдужність у комах. Так склалося історично. Проте стосовно хвороб людини симптоми і ознаки не слід плутати.

При зараженні деякими вірусами, наприклад депендовірусами, деякими вірусами герпесу і деякими реовірусами, захворювання не виникає. Зараження іншими вірусами, такими як парвовірус людини В19, поліовірус або вірус гепатиту В, може спричинити захворювання, а може і не призвести до захворювання. Інфекції, які не призводять до захворювань, називають субклінічними або безсимптомними.

Не треба плутати латентні вірусні інфекції з безсимптомними вірусними захворюваннями. Латентна вірусна інфекція не є продуктивною; у той же час безсимптомні вірусні захворювання спостерігаються на тлі продуктивної вірусної інфекції.

Складна взаємодія різних чинників визначає, чи викличе зараження вірусом захворювання, чи ні, і якщо захворювання буде викликано, в якому ступені тяжкості воно проявиться. До числа цих чинників належать особливості, пов'язані з вірусом, фактори, пов'язані з хазяїном, і втручання людини.

Для вірусів чинники, які впливають на результат зараження, включають такі:

- *Вірулентність певного штаму вірусу.* Вірулентність вірусу, як і іншого патогенного мікроорганізму, визначається мірою його хвороботворної здатності, тобто тяжкістю протікання викликаного ним захворювання. Наприклад, вірус грипу А має два антигени: гемаглютинін (H) і нейрамінідазу (N). Існує 13 варіантів H (H1–H13) і 9 варіантів N (N1–N9). Антигенні варіанти вірусу грипу А можуть поєднуватися в різних комбінаціях. Для людини тип H5N1 є більше вірулентним, ніж типи H1N1 і H3N2, оскільки при зараженні типом H5N1 захворювання минає важче.

- *Доза вірусу.* Більш висока доза вірусу може призводити до коротшого інкубаційного періоду, тобто часом між зараженням і проявом перших симптомів і/або ознак.

Чинники хазяїна, зараження, що впливають на результат зараження, включають ефективність роботи імунної системи. Слід зазначити, що сильніша імунна відповідь у хазяїна не гарантує видалення вірусу. ВІЛ продовжує реплікуватися у присутності високих рівнів специфічних для ВІЧ антитіл і Т-лімфоцитів. В деяких випадках симптоми і/або ознаки хвороби можуть бути наслідком імунної відповіді проти вірусу. Висипання при корі і поразки

при простому герпесі є клінічним проявом спроби тіла людини зруйнувати інфіковані вірусом клітини.

Втручання людини, яке впливає на результат вірусної інфекції у людини або тварин, полягає в призначенні противірусних антитіл або противірусних ліків.

Одужання хазяїна при вірусній хворобі може бути пов'язане з видаленням вірусу, що відбувається наприклад при звичайній вірусній застуді в дихальних шляхах або ротавірусній інфекції шлунково-кишкового тракту. Одужання може також супроводжуватися формуванням довготривалої інфекції, можливо і на все життя. Така персистентна інфекція, чи є вона продуктивною або латентною, може не мати подальших наслідків для хазяїна, або вона може викликати захворювання при старінні хазяїна. Зараження в дитинстві вірусом вітряної віспи може призводити до довічної латентної інфекції, яка може реактивуватися і викликати оперізуючий лишай. Тривале персистентне зараження людей і тварин деякими вірусами може призводити до формування злоякісних пухлин.

Додаткове читання до глави 6.

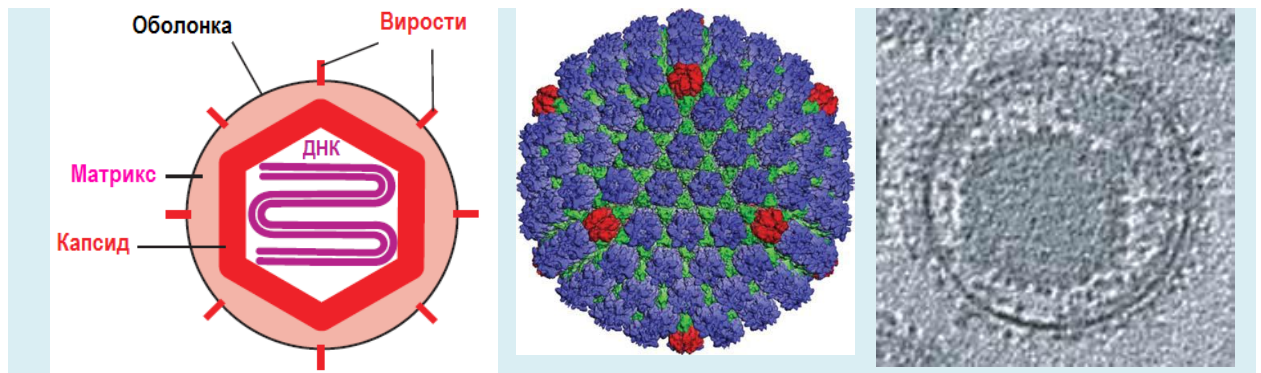
1. Кириченко А.М., Телегєєва Т.А., Коваленко О.Г. Молекулярно-генетичні механізми стійкості рослин до вірусів // Цитология и генетика.– 2007.–Т.41, №2.– С. 67–79.
2. Chen Y.-B., Fannjiang Y. Hardwick J.M. Cell death in viral infections. In: When Cells Die II. Ed. Lockshin R.A., Zakeri Z. Wiley, 2004.– P.436–460.
3. Iannello A., Debbeche O., Martin E., Attalah L.H., Samarani S., Ahmad A. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host // J. Leukoc. Biol. –2006.– V.79, №1.–P.16–35.
4. Kawai T., Akira S. Innate immune recognition of viral infection // Nat. Immunol. – 2006.– V.7, №2.–P.131–137.
5. Koyama S., Ishii K.J., Coban C., Akira S. Innate immune response to viral infection // Cytokine. – 2008.–V.43,№3.–P.336–341.
6. Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. Mechanisms of plant resistance to viruses // Nat. Rev. Microbiol. – 2005.– V3,№10.– P.789–798.
7. Stram Y., Kuzntzova L. Inhibition of viruses by RNA interference // Virus Genes. – 2006.– V.32, №3.–P.299–306.

Глава 7. Основні родини вірусів, які викликають захворювання людини і тварин

7.1. Віруси з дволанцюговою ДНК

7.1.1. Родина *Herpesviridae*

Назва родини походить від грецького слова *herpein*, що означає повзати, що повзе. Виділено більше 100 вірусів цієї родини, що вражають людей і інших ссавців, птахів, риб, рептилій, амфібій і моллюсків. Вісім вірусів є вірусами людини. Герпесвірусами заражена переважна більшість населення нашої планети. Характеристика сімейства приведена у підпису до мал. 7.1. Реплікація геномної ДНК вірусу була обговорена в розділі 4.3.1.3.



Мал. 7.1. Віріон вірусів родини *Herpesviridae*. Зліва направо: структура, реконструкція, електронна мікрофотографія. Геном являє собою лінійну дволанцюгову ДНК, розмір якої у різних вірусів герпесу варіює від 125 до 240 т.п.н. Складні віріони діаметром від 120 до 300 нм складаються з трьох частин: капсид, матрикс і оболонка. Капсид ікосаедричний, складається з 162 капсомерів, 12 з яких є пентони, а інші – гексони. У матриксу міститься, щонайменше, 15 видів білків, а також деякі молекули мРНК вірусу.

Примітною особливістю герпесвірусів є та, що, одного разу заразивши хазяїна, вони часто залишаються як персистентна інфекція впродовж усього його життя. Часто ця інфекція є латентною, яка час від часу реактивується, особливе при послабленні імунітету хазяїна. Як первинна, так і реактивована інфекція герпесвірусів може бути або безсимптомною, або викликати захворювання різного ступеня тяжкості.

7.1.1.1. Герпесвіруси людини

У людини виявлені вісім вірусів герпесу.

Віруси простого герпесу 1 і 2.

Віруси простого герпесу 1 і 2 спочатку заражають епітеліальні клітини слизової оболонки ротової порожнини або геніталій, шкіри або рогівки. Вірус може проникати в нервові клітини і транспортуватися в їх ядра, де здатен переходити у форму латентної інфекції.

Вірус простого герпесу 1 гушавині найчастіше заражає через губи або ніс. Латентна інфекція може реактивуватися, наприклад, при стресах або зниженні імунітету при застуді, переохолодженні. Реактивація призводить до утворення віріонів, які приблизно в 20–40 відсотках випадків переміщуються усередині нервових волокон до місця первинної інфекції, де віруси викликають продуктивне зараження епітеліальних клітин, що призводять до захворювання – герпесу. Іноді можуть бути серйозні ускладнення у вигляді так званого герпетичного енцефаліту.

Вірус простого герпесу 2 зазвичай є збудником генітального герпесу, хвороби, що передається статевим шляхом. Він може передаватися вертикально, від дитини матері, під час

внутрішньоутробного розвитку або при пологах, і у новонароджених він може призводити до серйозного захворювання, що призводить до смертельного результату приблизно в 54% випадків.

Специфічність вірусів до частин тіла не є абсолютною, і є випадки, коли вірус простого герпесу 1 інфікує геніталії, а вірус простого герпесу 2 обличчя. Крім того, у момент реактивації вірусу людина сама може перенести вірус з одного місця тіла на інше.

Вірус вітряної віспи (вірус герпесу 3).

Вірус передається повітряно-крапельним шляхом. Зараження вірусом вітряної віспи відбувається зазвичай в дитинстві і призводить до захворювання вітряною, коли вірус поширюється по крові до шкіри, викликаючи висип. Також він може поширитися до нервових клітин, де переходить в латентний стан. Найчастіше вражаються нерви, які розташовані в ділянці обличчя або тулуба, і ці ділянки тіла є найбільш звичайним місцем прояву оперізувального герпесу, або оперізувального лишаю, коли латентна інфекція реактивується.

Вірус Епштейна-Барр (вірус герпесу 4).

Вірус Епштейна-Барр передається слиною. Спочатку заражаються епітеліальні клітини, далі вірус поширюється у В-лімфоцити, які є основними клітинами для цього вірусу, і викликає їх проліферацію. Цим вірусом заражаються більше 90% людей, особливо впродовж перших років життя, коли інфекція протікає практично безсимптомно. У розвинених країнах частина людей заражаються в підлітковому віці, в період статевого дозрівання. При зараженні в цей час часто розвивається інфекційний мононуклеоз, або залізиста лихоманка. Оскільки вірус передається слиною, у лікарів така форма захворювання підлітків і молоді часто носить назву "хвороби поцілунків". Крім того, у людей вірус Епштейна-Барр асоційований з розвитком низки злоякісних пухлин.

Цитомегаловірус людини (вірус герпесу 5).

Має виражений тропізм до тканин слинної залози. Є досить розповсюдженим, зустрічається приблизно в 40% людей. Зараження цим вірусом може відбуватися повітряно-крапельним шляхом, а також через слину при поцілунках, статевим шляхом, при переливанні крові, при пологах і під час перебування дитини в утробі при вагітності, через молоко матері при грудному годуванні дитини.

При переважній більшості випадків зараження людей цитомегаловірусами симптоми або відсутні, або є слабкими. Проте у вагітних жінок вірус може заразити плаценту і згодом плід, для якого зараження може виявитися дуже серйозним. У США приблизно 1% дітей народжуються зараженими цим вірусом. Приблизно у 7% заражених новонароджених є викликані вірусом ушкодження, включаючи маленький розмір мозку і збільшення печінки і селезінки. У інших новонароджених ушкодження можуть проявитися на пізнішій стадії, включаючи втрату слуху або затримку розумового розвитку.

При зараженні в дорослішому стані, цитомегаловірус зазвичай себе ніяк не проявляє. Проте у декотрих пацієнтів з ослабленим імунітетом, наприклад у хворих СНІДом, у кого проводиться загальноприйнята протипухлинна терапія або кому призначають імунодепресанти після пересадки органів, цитомегаловірус може викликати серйозні захворювання, включаючи пневмонії і гепатити.

Вірус герпесу людини 6

ВГЛ-6 репродукується в Т-, В-лімфоцитах і макрофагах, більшою мірою вражаючи Т-лімфоцити. Має тропізм до гліальних клітин.

Механізм і шляхи передачі вивчені недостатньо. У природних умовах інфекція поширю-

ється повітряно-крапельним і орально-оральним шляхами, оскільки ВГЧ-6 постійно виявляють в носоглотковому слизі і слині інфікованих осіб. Інфекція широко поширена серед людей, вірус мають від 60 до 96% здорових дорослих. У переважної більшості заражених ВГЧ-6 формується латентна інфекція. При зараженні дітей можливий розвиток так званого раптового висипу, моновірусоподібного синдрому. Цей синдром виникає через 20–60 діб після зараження і триває 2–6 тижнів. Виявляється він високою температурою, ознобом, стомлюваністю, нездужанням та головним болем. У більшості випадків моновірусоподібний синдром закінчується повним одужанням.

Вірус герпесу людини 7.

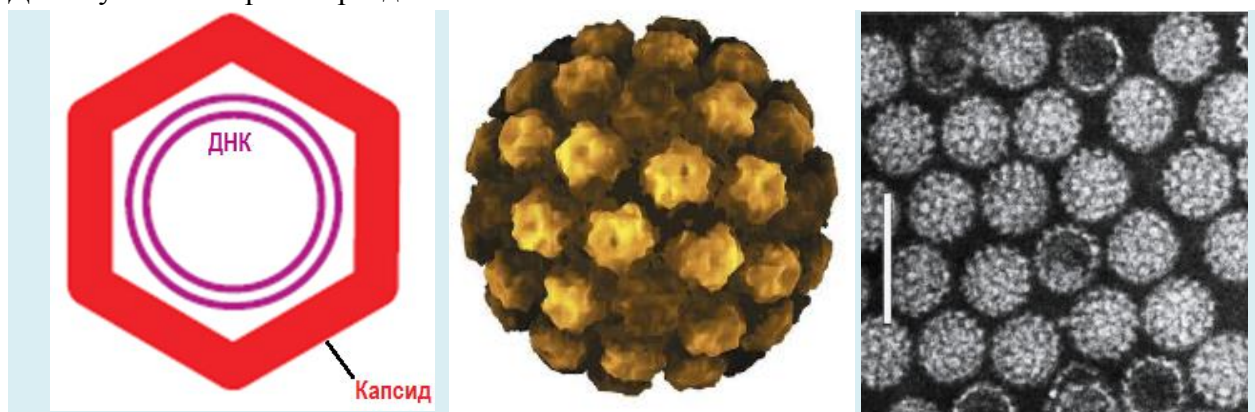
ВГЛ-7 був виділений в культурі CD4 Т-лімфоцитів, які мають рецептори до цього вірусу. Вірус, разом у ВГЧ-6, був пов'язаний з рядом випадків раптового висипу. Є однією з можливих причин синдрому хронічної втоми.

Герпесвіруси, що асоціюються з саркомою Капоші (вірус герпесу людини 8).

У 1994–1995 рр. у хворих СНІДОМ в тканинах саркоми Капоші були виявлені унікальні послідовності нуклеотидів, частково гомологічні послідовностям ДНК вірусу Епштейна-Барр. Ще не виділений вірус, якому належали ці унікальні послідовності, був названий герпесвірусом людини типу 8. Його роль в етіології саркоми Капоші і інших пухлин залишається дискусійною.

7.1.2. Родини Papillomaviridae і Polyomaviridae

До цих родин належать віруси з невеликими віріонами, які містять замкнену в кільце дволанцюгову ДНК. Характеристика приведена у підпису до мал. 7.2, реплікація геномної ДНК була обговорена в розділі 4.3.1.2.



Мал. 7.2. Віріон вірусів родин *Papillomaviridae* і *Polyomaviridae*. Зліва направо: структура, реконструкція, електронна мікрофотографія. Смужка на фотографії дорівнює 100 нм. Геном являє собою замкнуту в кільце дволанцюгову ДНК (близько 8 т.п.н. у папіломавірусів і близько 5 т.п.н. у поліомавірусів). Віріони без оболонки, ікосаедричні, діаметром 55 нм у *Papillomaviridae* і 40–45 нм у *Polyomaviridae*, складаються з 72 капсомерів ($T=7$), 12 з яких є пентони, а 60 – гексони.

Є більше 100 типів папіломавірусів людини, що розрізняється по послідовності ДНК. Назва родини походить від латинського слова *papilla* – сосочок і грецького слова *oma* – пухлина. Вони потрапляють в організм через невеликі садна і заражають клітини шкіри (кератиноцити) або клітини слизової оболонки, що синтезують кератин. Кожен тип папіломавірусу людини заражає переважні ділянки, такі як руки або інші місця, і зараження може привести до утворення бородавки (папіломи). Також можуть бути причиною виникнення злоякісних пухлин.

Віріони поліомавірусів подібні до віріонів папіломавірусів, проте дещо менше по розмірах. У латентному стані поліомавіруси виявлені в хромосомах різних ссавців. У людини

поліомавіруси розвитку пухлин не викликають. Характерний представник – вірус мавп 40 (SV40), яким заражені сотні мільйонів людей.

При зараженні новонароджених мишей, щурів, кроликів та інших лабораторних тварин поліомавіруси викликають розвиток різних видів сарком і карцином. Цей факт і послужив причиною назви родини вірусів (від грец. *poly* – багато і *oma* – пухлина, скупчення).

Є докази, що поліомавіруси можуть викликати низку злоякісних пухлин у людини, проте така можливість залишається дискусійною.

7.1.3. Родина *Poxviridae*

До цієї родини належать віруси, патогенні для людини (вірус натуральної віспи), а також патогенні для багатьох інших ссавців, птиць і комах.

Геном поксвірусів являє собою дволанцюгову лінійну ДНК, кінці ланцюгів якої ковалентно зв'язані. Реплікація вірусу відбувається в цитоплазмі, оскільки не залежить від білків клітини-хазяїна; усі необхідні білки кодує вірус. Реплікація геному поксвірусів була розглянута в розділі 4.3.1.4.

Віріони є великими, плеоморфні, звичайно нагадують цеглини з закругленими кінцями, розміром 220–450×140–260 нм, укрите ліпопротеїновою мембраною, на поверхні якої помітні паличкоподібні або округлі структури (мал. 7.3). Мембрана укриває двовігнуту або циліндричну серцевину (кор), яка складається з ДНК і білків і формує нуклеопротеїновий комплекс. У зоні між стінкою кори і мембраною, певно, присутні одно чи два латеральні тіла, структура і функція яких залишаються неясними.



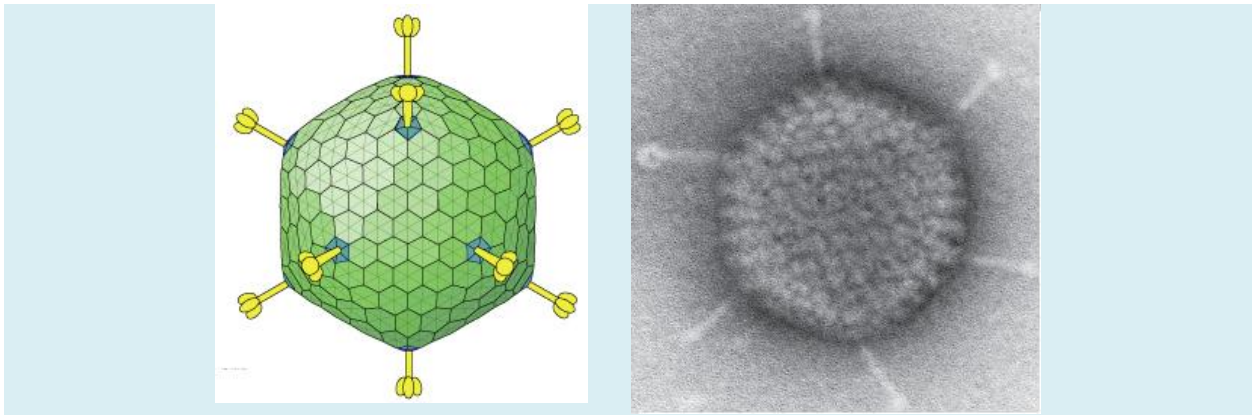
Мал. 7.3. Віріон вірусів родини *Poxviridae*. Ліворуч – передбачувана структура віріону, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів вірусу натуральної віспи.

Протягом морфогенезу віріонів, поксвіруси можуть утворювати декілька форм. Так звані внутрішньоклітинні зрілі віріони мають на поверхні мембрану. Деякі з цих віріонів укриваються подвійною мембраною, брудкуючись через везикули апарату Гольджі або ендосоми, утворюючи так звані внутрішньоклітинні окутані віруси. Далі ці віріони можуть зливатися з плазматичною мембраною, втрачаючи один шар подвійної мембрани, і вивільнятися з клітини, формуючи так звані позаклітинні окутані віруси.

7.1.4. Родина *Adenoviridae*

Назва вірусів цієї родини походить від грець. *adeno* – залоза, оскільки перші представники цієї групи вірусів були виділені з аденоїдів людини.

Геном являє дволанцюгову лінійну ДНК. Характеристика сімейства приведена у підпису до мал. 7.4. Реплікація геномної ДНК вірусу була обговорена в розділі 4.3.1.4.



Мал. 7.4. Віріон вірусів родини *Adenoviridae*. Ліворуч – реконструкція віріону, праворуч – електронна мікрофотографія. Віріони не мають оболонки, 70–90 нм діаметром. Капсид з ікосаедричною симетрією (T=25) складається з 240 гексонів і розташованих на вершинах віріона 12 пентонів, які служать основою для довгих фібрил, що виступають.

У людини аденовіруси є звичайними збудниками ОРЗ і кон'юнктивітів, а також кишкових інфекцій.

7.2. Віруси з одноланцюговою ДНК

7.2.1. Родина *Parvoviridae*

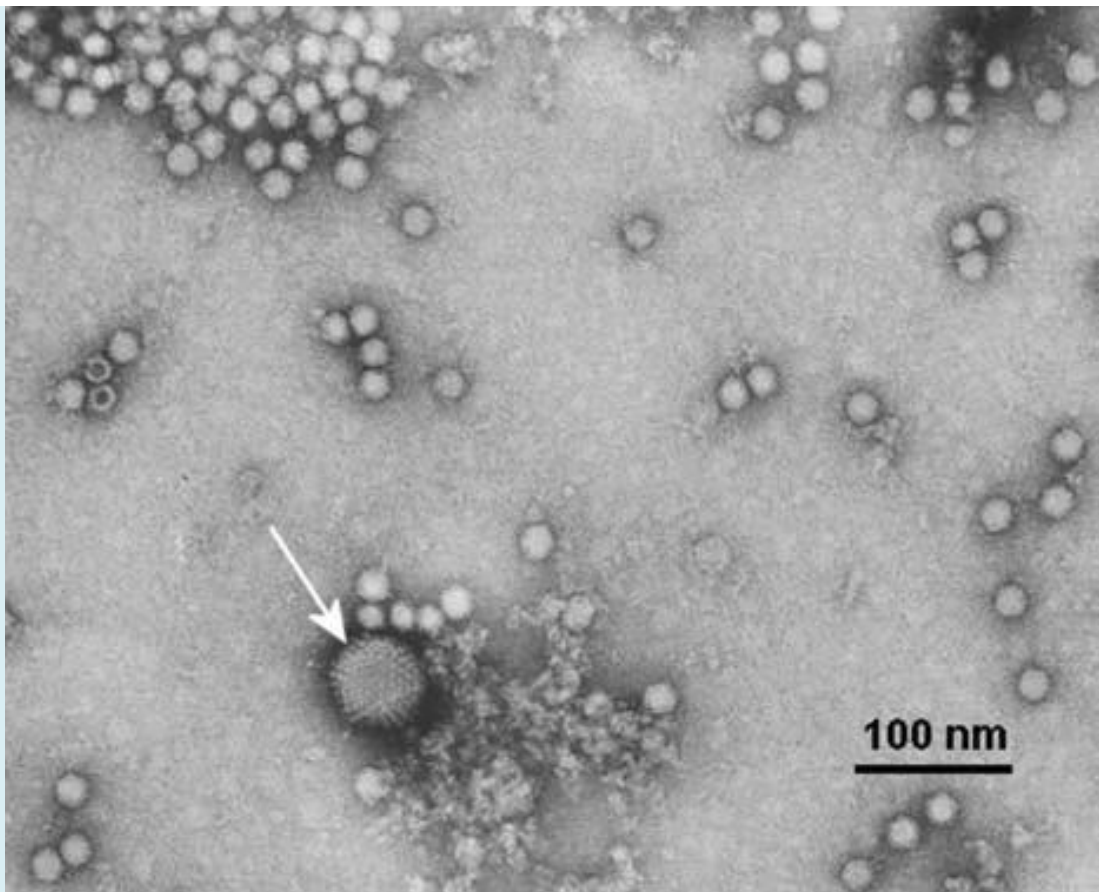
Парвовіруси є одними з найменших з відомих вірусів, віріони яких мають діаметри в межах 18–26 нм. Свою назву вони дістали від латинського слова *parvus* – маленький. Родину розділяють на дві підродини: *Parvovirinae* (віруси хребетних) і *Densovirinae* (віруси безхребетних).

Геном парвовірусів являє собою одноланцюгову лінійну несеgmentовану ДНК. Віріони не мають оболонки, 18–26 нм діаметром. Капсид ікосаедричної форми, побудований з 60 білкових субодиниць, тобто містить мінімальну кількість молекул білку, яка формує ікосаедр.

Подробиці реплікації геномної ДНК вірусів родини *Parvoviridae* були обговорені в розділі 4.3.1.6.

Підродина *Parvovirinae* включає цікавий рід *Dependovirus*, члени якого є дефектними і можуть нормально реплікуватися тільки при зараженні клітини спільно з вірусом-помічником. Інші парвовіруси, які не потребують присутності вірусу-помічника, називають автономними парвовірусами.

Перший депендовірус, який спостерігали в електронному мікроскопі, виглядав як забруднення препарату аденовірусу (мал. 7.5). Це забруднення, проте, виявилось вірусом-сателітом, реплікація якого залежала від аденовірусу. Цей вірус-сателіт дістав назву аденоасоційованого вірусу. У препаратах аденовірусів були також виявлені і інші депендовіруси; виявилось, що депендовірусна інфекція повсюдно поширена.



Мал. 7.5. Віріон аденовірусу (указаний стрілкою) і депендовіруси.

Депендовіруси виявилися дуже корисним вектором для вбудовування генів в культури клітин для продукування певних білків. Також вони досліджуються як потенційний вектор для вбудовування генів в клітини пацієнтів, що мають генетичні захворювання і пухлини. Цінною перевагою депендовірусів перед іншими системами є те, що вони не викликають ніяких захворювань, на відміну від інших вірусів, які також намагаються використати як вектори, наприклад ретровірусів.

Парвовіруси, які не вимагають вірусів-помічників, виявляють в сироватці крові, яку здають здорові донори. Вірус, який був названий по партії крові В19, заражає попередники червоних клітин крові. Багато випадків зараження вірусом В19 не призводять ні до яких симптомів або ознак захворювання, проте в деяких випадках спостерігаються хвороби, такі як інфекційна еритема. Інфекційна еритема – поширене дитяче захворювання при якому у дітей з'являється така ознака, як "нашльопані щоки" (мал. 7.6).

Інші захворювання, що викликаються вірусом В19, включають:

- гострий артрит;
- апластическая анемія у осіб з хронічною гемолітичною анемією;
- набряк плоду (інфекція може переміститися від вагітної жінки до плоду і може його убити).



Мал. 7.5. Дитина, хвора на інфекційну еритему ("нашльопані щоки")

У 2005 році був відкритий новий парвовірус людини при використанні методики молекулярного скринінгу для дослідження носоглоткових виділень у дітей із захворюванням нижніх дихальних шляхів. Цей вірус був віднесений до раніше відомого роду *Bocavirus*.

Віруси підродини *Densovirinae* викликають утворення щільних включень в ядрах заражених клітин. Деякі з них являються патогенами тutowого шовкопряда і можуть викликати економічні втрати при виробництві шовку.

Віріони парвовірусів прикріплюються до рецепторів на поверхні потенційних клітин-хазяїв. У випадку вірусу B19, хазяями є попередники червоних кров'яних тілець, а рецептором служить антиген групи крові Р. Віріон входить в клітину за допомогою ендцитозу, вивільняється в цитоплазму, асоціює з мікротрубочками і спрямовується до ядерної пори. Віріони парвовірусів досить малі, щоб проходити через ядерну пору. У білків капсиду деяких парвовірусів знайдений сигнал ядерної локалізації. При виході віріонів з клітини оболонка ядра і клітинна мембрана розриваються, і клітина гине.

Коли клітина заражена депендовірусом і відповідним вірусом-помічником, відбувається продуктивна інфекція обох вірусів. Проте клітина може бути заражена депендовірусом у відсутності вірусу-помічника. В цьому випадку геном депендовірусу, після перетворення на форму дволанцюгової ДНК, може інтегруватися в хромосому клітини. Це призводить до латентної інфекції. У клітинах людини депендовірус завжди інтегрується в специфічній ділянці хромосоми 19. Латентна депендовірусна інфекція знайдена у низці клітинних ліній, що походять від людей або мавп. Якщо клітина з латентною інфекцією депендовірусу виявиться зараженою відповідним вірусом-помічником, спостерігається продуктивна інфекція обох вірусів.

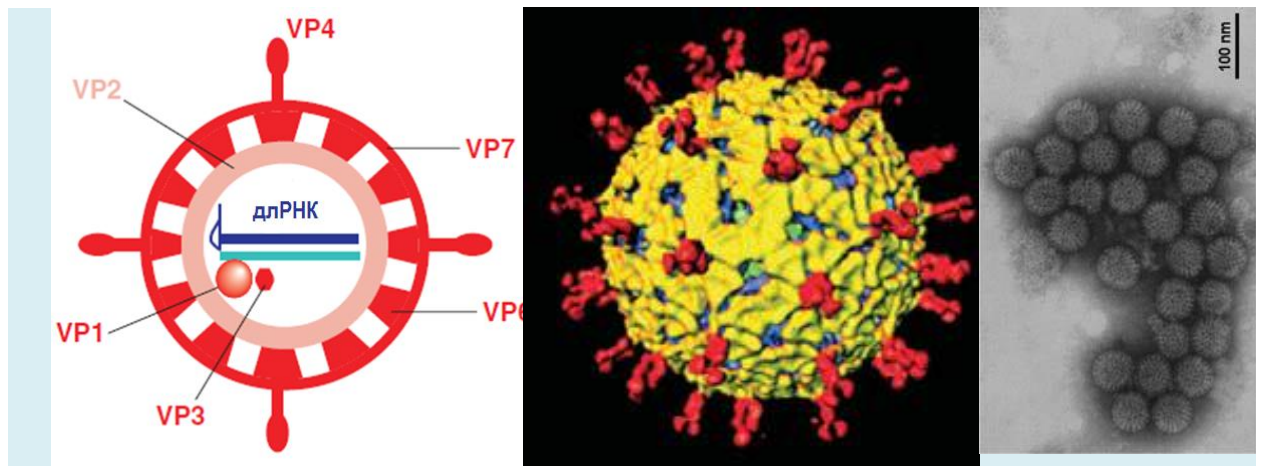
7.3. Віруси з дволанцюговою РНК

7.3.1. Родина *Reoviridae*

Велике число вірусів цієї родини виявлені у тварин, рослин і грибів. Багато хто з цих вірусів викликає захворювання, проте за нами зберегли початкову назву реовіруси, яка була дана тоді, коли з цими вірусами не асоціювали хвороби (reovirus – *r*espiratory *e*teric *o*rphan *v*iruse, дихальний кишковий сирітський вірус).

Геном вірусів цієї складається з 9, 10, 11 або 12 сегментів дволанцюгової лінійної РНК. Віріони не мають оболонки, 60–80 нм діаметром. Капсид має ікосаедричну симетрію. Білки капсиду організовані в один, два або три шари, які оточують геном.

Найбільший інтерес в цій родині викликають віруси роду *Rotavirus* (ротавіруси), оскільки їх найактивніше вивчали як важливих агентів гастроентеритів людей і тварин. Ротавіруси вперше були відкриті в 1963 році, коли під електронним мікроскопом вивчали фекалії мавп і мишей. Були описані округлі віріони діаметром близько 75 нм із структурою, що нагадує спиці колеса (мал.7.6). По зовнішньому вигляду віруси і були названі (від латинського слова *rota* – колесо). Схожі віруси через 10 років спостерігали в зразках фекалій дітей, що страждали діареєю.



Мал. 7.6. Віріон вірусів роду *Rotavirus*. Зліва направо: структура, реконструкція, електронна мікрофотографія. Капсид має ікосаедричну симетрію, побудований з трьох шарів, кожен з яких складається з окремого вірусного білку VP. Внутрішній і середній шари складаються з білків VP2 і VP6 відповідно і мають перфорації у вигляді каналів. Середній шар і складається зі свого роду "спиць колеса", що і надає віріонам їх вигляд. Зовнішній шар складається з білку VP7, який є гликозильованим. Віріон містить ще три види білку: VP1 і VP3 містяться в ядрі (корі), а VP4 утворює 60 виступів на поверхні. На схемі зліва показані тільки чотири з 60 виступів, утворених білком VP4, і один з 11 сегментів длРНК.

Ротавіруси заражають клітини, що називаються ентероцитами, на кінці ворсинок, що формуються в тонкій кишці. Механізм прикріплення і проникнення в клітину у ротавірусів погано зрозумілий. Передбачається, що рецепторами на поверхні клітин можуть бути інтегрини. Для ротавірусів припускається, що вони можуть входити в клітину або за допомогою прямого проникнення, або за допомогою ендоцитозу. Вивільнення віріонів з клітини відбувається або завдяки лізису клітини, або за допомогою екзоцитозу.

В результаті зараження ротавірусами ентероцити руйнуються, і це призводить до зниження інтенсивності поглинання води, солей і цукрів з просвіту кишки. Окрім цього, щільні контакти між клітинами порушуються завдяки неструктурному білку вірусу NSP4; через це в просвіт кишечника поступають рідини. Усі ці ефекти вірусного зараження, разом з виділенням води і розчинів секреторними клітинами, призводить до діареї і обезводнення.

Лікування є відносно простим, і включає відновлення змісту вологи у пацієнта розчинами солей і цукрів, але ці засоби в деяких частинах земної кулі недоступні. В наслідок цього через ротавірусну інфекцію щороку на Землі помирає близько півмільйона немовлят і маленьких дітей.

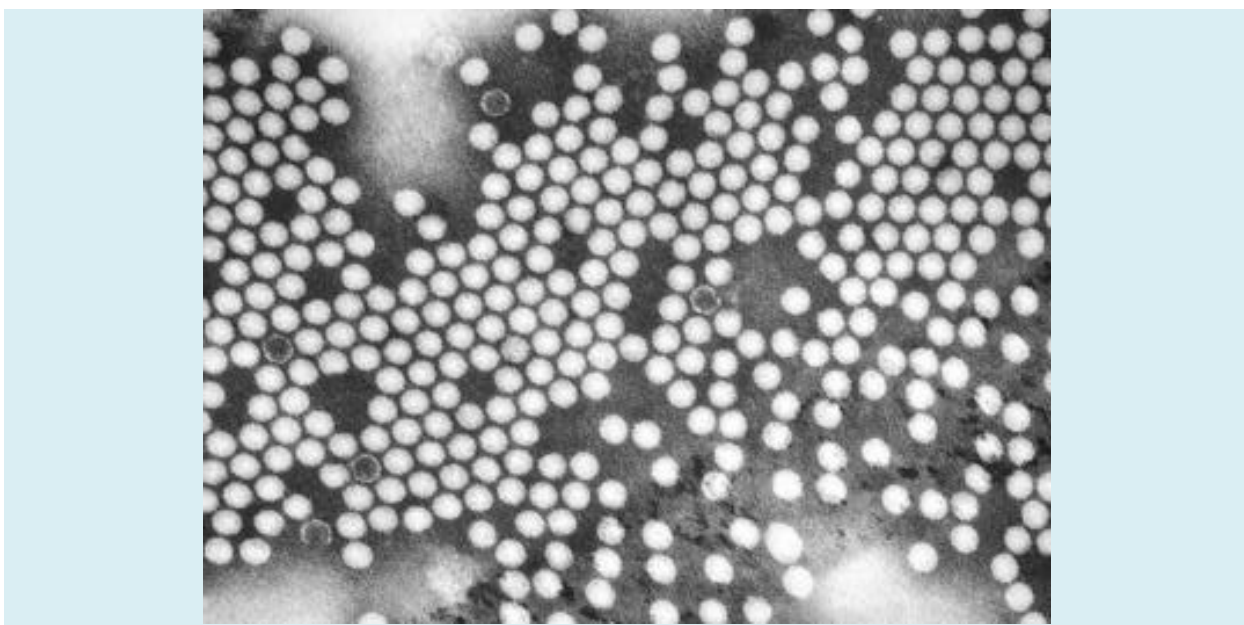
Проблемою для вірусів з дволанцюговою РНК є те, що така РНК є індуктором низки захисних реакцій клітини, включаючи сайленсінг РНК. Більшість з цих вірусів, включаючи ротавіруси, вирішують цю проблему у такий спосіб, що їх РНК увесь період реплікації залишається усередині структури з вірусних білків і не вивільняється в цитоплазму.

7.4. Віруси, що містять плюс-ланцюг РНК

7.4.1. Родина *Picornaviridae*

Представники пікорнавірусів виявлені у ссавців і птахів. Свою назву пікорнавіруси отримали від сполучення іспанського слова *pequeño* – мала величина і англомовного скорочення RNA (РНК). Таким чином, пікорнавіруси є невеликими РНК-геномними вірусами, що мають відносно просту структуру. Пікорнавіруси належать до класу IV по класифікації Балтімора; їх геном представлений плюс-ланцюгом РНК, який може функціонувати як мРНК при вивільненні в цитоплазму.

Віріони не мають оболонки, 22–30 нм у діаметрі. Капсид пікорнавірусів має ікосаедричну симетрію і побудований з 60 структурних одиниць, кожна з яких складається з однієї копії вірусних білків, які позначають як VP1, VP2, VP3 і VP4 (мал.7.7).



Мал. 7.7. Електронна мікрофотографія віріонів пікорнавірусів.

Деякі пікорнавіруси є дуже важливими, оскільки викликають важкі захворювання у людини і свійських тварин.

Вірус гепатиту А.

Гепатит А особливо поширений в країнах, що розвиваються, з поганою санітарією. У більшості новонароджених або маленьких дітей інфекція протікає безсимптомно або з середньою тяжкістю, і призводить до довічного імунітету. При зараженні дорослих людей в 75% випадків розвивається жовтяниця. Рідкісним ускладненням є важкий гепатит, який може бути фатальним. Вірус добре передається по фекально-оральному шляху, через зара-

жену їжу і воду. Після попадання в організм, вірус гепатиту А проникає в кровеносну систему через клітини епітелію ротової частини глотки або кишкового. Вірус є гепатотропним, і коли кров переносить його до печінки, вірусні частки заражають гепатоцити і клітини Купфера (спеціалізовані макрофаги печінки, що руйнують в першу чергу нефункціональні клітини крові).

Поліовірус.

Поліовірус, збудник поліомієліту, є об'єктом пильних досліджень, оскільки може призводити до паралічу. Фактично у більшості випадків зараження вірусом поліомієліту виявляється безпечніше за інші інфекції ротоглотки або кишкового. Серйозне захворювання відбувається тільки після того, як зараженими стають інші тканини внаслідок віремії – попадання вірусу в кров – і поширення вірусу до центральної нервової системи.

Збудник належить до групи ентеровірусів (кишкових вірусів). Джерело інфекції – людина (хворий або той, що переносить зараження безсимптомно); збудник виділяється через рот і з екскрементами. Зараження може статися повітряно-краплинним шляхом, але частіше – при попаданні в рот активного вірусу (через забруднені руки, їжу). Механічним переносником вірусу можуть бути мухи.

Вхідними воротами інфекції є слизова оболонка носоглотки або кишкового. Під час інкубаційного періоду вірус розмножується в лімфоїдних утвореннях глотки і кишкового, потім може проникнути в кров і досягти нервових клітин. Зараження поліовірусами центральної нервової системи може привести до менінгіту (після якого більшість пацієнтів повністю видужують), енцефаліту і/або паралітичного поліомієліту. Паралітичний поліомієліт обумовлений реплікацією вірусів в моторних нейронах спинного мозку або стоволової частини головного мозку. Нервові клітини піддаються дистрофічно-некротичним змінам, розпадаються і гинуть, що призводить до паралічу м'язів кінцівок або навіть дихальних м'язів. У м'язах, іннервація яких постраждала, розвивається атрофія (мал. 7.8).



Мал. 7.8. Діти, уражені паралітичним поліомієлітом.

Цікаво, що незабаром після входу вірусу поліомієліту в клітину, експресія генів хазяїна

припиняється. Було показано, що у клітинах, заражених поліовірусом, усі три типи РНК-полімераз хазяїна інгібуються, припиняючи транскрипцію. Трансляція існуючих мРНК хазяїна також припиняється, оскільки протеаза вірусу розщеплює фактори ініціації трансляції клітини-хазяїна. Ці фактори потрібні для трансляції кепованих мРНК, проте оскільки мРНК вірусу не мають кепа і використовують незалежний від кепа механізм трансляції, трансляція вірусного білку не порушується.

Спалахи поліомієліту стимулювали дослідницькі програми по розробці вакцин, і ці зусилля привели до появи інактивованої вакцини і атенуйованої (ослабленої) вакцини. Використання обох типів вакцини забезпечило дуже ефективну профілактику поліомієліту, і на початку 21 століття щорічна кількість випадків захворювання знизилася до 3500, що складає 1% випадків від 1988 року. Поліомієліт фактично є викорененим у багатьох частинах земної кулі; очікується, що незабаром станеться його повна ліквідація.

Вірус Коксакі.

Віруси Коксакі – це ентеровіруси, які добре розмножуються в шлунково-кишковому тракті. Назву дістали по місту Коксакі (США), де вони були знайдені в 1948 році дослідниками, які шукали спосіб лікування поліомієліту. Ці віруси можуть викликати ряд медичних проблем, включаючи міокардит, менінгіти і висипи.

Риновіруси.

Риновіруси є найбільш звичайними агентами, що викликають інфекції верхніх дихальних шляхів у людей (ОРЗ). У дорослих близько 50% випадків застуди викликані саме риновірусами. Реплікація риновірусів відбувається в епітелії верхніх дихальних шляхів. Деякі риновіруси ймовірно можуть викликати захворювання і нижніх дихальних шляхів.

Вірус ящура.

Вірус ящура має набагато ширше коло хазяїв, ніж інші пікорнавіруси. Він заражає цілу низку ссавців, таких як корови, вівці, кози і свині. Вірус ящура проявляє дерматотропність, тобто тропізм до клітин шкірних покривів. У хворих тварин стають ураженими ступні і язики. Вірус ящура у випадку епізоотій заподіює величезний збиток тваринництву.

7.4.2. Родина *Flaviviridae*

Родина дістала таку назву від вірусу жовтої лихоманки (лат. *flavus* - жовтий). Жовта лихоманка, у свою чергу, зветься так через жовтяницю, що розвивається у деяких пацієнтів.

Геном складається з несеgmentованої одноланцюгової (+)РНК, яка одночасно є мРНК вірусу. Особливістю геномної РНК вірусу є відсутність полі(А) хвоста на 3'-кінці.

Віріони покриті ліпідною оболонкою, мають сферичну форму, діаметр близько 40–60 нм; розмір віріонів варіює у різних родів.

Родина містить низку некласифікованих вірусів і три роди:

Flavivirus – характерні види вірус жовтої лихоманки, вірус Західного Нілу, вірус лихоманки Денге.

Hepacivirus – цей рід містить єдиний вид, вірус гепатиту С.

Pestivirus – характерні види вірус діареї худоби, вірус класичної лихоманки або чуми свиней.

Найбільш небезпечними захворюваннями, які викликають віруси цієї родини, є такі.

Жовта лихоманка – гостре захворювання вірусної етіології, поширене в Африці і Південній Америці. Передається з укусом комарів. Джерелом і резервуаром інфекції служать дикі тварини (мави, опосуми, рідко інші види), а також хвора людина. Переносники – комарі.

Існує три варіанти жовтої лихоманки у людей. Це лихоманка джунглів (сільський тип), міська лихоманка і проміжний тип. При сільському типі у тропічних лісах (сельві) жовта лихоманка має місце у мавп, інфікованих укусами "диких" комарів (комарі роду *Aedes*). Заражені мавпи можуть поширювати інфекцію, передаючи її здоровим комарам. Інфіковані "дики" комарі з укусом передають вірус людям, що знаходяться в лісі. Цей ланцюжок приводить до окремих випадків інфекції переважно у молодих людей, що працюють на лісозаготівлі, не приводячи до епідемій і великим спалахів. Інфекція також може поширюватися і між інфікованими людьми. Проміжний варіант інфекції має місце у вологих або напівсухих африканських саванах, є домінуючою формою інфекції на території континенту. Мають місце епідемії обмеженого масштабу, що відрізняються від міського варіанту інфекції. "Полу-домашні" комарі заражають і тварин, і людей. При таких епідеміях одночасно може бути уражено кілька сіл, однак летальність при цьому варіанті жовтої лихоманки нижче, ніж при міському. Міський варіант інфекції супроводжується епідеміями великого масштабу, які викликані припливом мігрантів в урбанізовані регіони, що відрізняються високою щільністю населення. "Домашні комарі" (виду *Aedes aegypti*) переносять вірус від людини до людини, мавпи не беруть участь в епідемічній ланцюжку передачі захворювання.

Загалом, щорічно у світі відбувається близько 200000 випадків захворювання жовтою лихоманкою, з яких 15% закінчуються смертю.

Вірус жовтої лихоманки проникає в організм людини при укусі інфікованим комаром. Відомі випадки лабораторних заражень аерогенним шляхом. Від місця впровадження збудник поширюється по лімфатичних шляхах і досягає регіонарних лімфатичних вузлів, де відбувається його реплікація і накопичення. Через декілька днів вірус проникає в кров, де його можна виявити впродовж 3–5 днів. Гематогенним шляхом вірус проникає в різні органи (печінка, селезінка, нирки, кістковий мозок, лімфатичні вузли), викликаючи їх ураження. Розвивається тромбгеморагічний синдром, який проявляється у вигляді множинних крововиливів в різних органах. Ураження печінки веде до вираженої жовтяниці. Зміни виявляють в нирках (набряк, крововиливи, некроз ниркових канальців), селезінці, міокарді, лімфатичних вузлах.

У важких випадках смерть настає від ниркової недостатності або інфекційного колапсу (інфекційно-токсичного шоку). При сприятливому результаті з 7–9-ї діб стан хворого поступово покращується. У легких випадках симптоми хвороби виражені слабо, жовтяниці і тромбгеморагічного синдрому може не бути. При дуже важких формах хворі можуть померти на 2–3-й день хвороби ще до розвитку жовтяниці (блискавична форма).

У людей, що перенесли хворобу виникає довічний імунітет.

Специфічних препаратів для лікування жовтої лихоманки не існує.

Заходи профілактики включають вакцинацію людей, що виїжджають в ендемічні райони. Вакцина містить ослаблений вірус, і надійний імунітет розвивається впродовж одного тижня у 95% прищеплених і зберігається впродовж 30–35 років (можливо довічно).

Хворий є джерелом зараження навіть при легких формах захворювання і має бути абсолютно захищений від укусів комарів. З цією метою навколо ліжка встановлюють сітки, металеві або марлеві. Така ізоляція хворого потрібна упродовж перших 4 днів, оскільки пізніше за цей термін він вже не є джерелом зараження комарів.

Неспецифічна профілактика включає запобігання укусам комарів і дезінфекцію довколишніх водойм.

Лихоманка Денге – є прикладом раніше розглянутого процесу залежного від антитіл підвищення інфективності вірусу (розділ 4.1.1). Вірус лихоманки Денге передається комарами

і при первинному зараженні викликає середньої тяжкості гарячковий стан, схожий з грипом, або не викликає ніяких симптомів. Віруси циркулюють в крові інфікованих людей впродовж 2–7 днів, і приблизно впродовж цього ж часу триває лихоманка. Після первинного зараження у людини залишаються антитіла до вірусу, і при повторному зараженні, використовуючи антитіла як рецептори, вірус заражає моноцити і макрофаги. Активна реплікація вірусу в цих клітинах може призводити до серії вторинних реакцій (активація комплементу, системи кінінів та ін.) і до розвитку тромбогеморагічного синдрому, що призводить до загрозливої для життя геморагічної лихоманці Денге або шокового синдрому Денге. При цьому у хворого підвищується проникність і крихкість капілярів, знижується зміст тромбоцитів, розвивається кровотеча внаслідок недостатності деяких факторів системи згортання крові. Геморагічні прояви виникають не лише в шкірі, слизових оболонках, але і у внутрішніх органах: ендо- і перикарді, плеврі, очеревині, слизовій оболонці шлунку, кишковика, головному мозку.

Гепатит С. Гепатит С звать "ласкавим вбивцею" через здатність маскувати істинну причину під виглядом безлічі інших захворювань. При цьому він щорічно вбиває більше півмільйона жителів нашої планети. Зараження вірусом гепатиту С відбувається парентерально, тобто не через шлунково-кишковий тракт. Заразитися гепатитом, який знищує печінку, можна в манікюрному кабінеті, через зубну щітку, при переливанні крові, через шприц, в перукарні, роблячи пірсинг або татуювання. Джерелом інфекції є хворі з активною формою гепатиту С і люди, що несуть вірус в латентній формі.

Від моменту зараження до клінічних проявів проходить від 2-х до 26-и тижнів.

У більшості випадків ніяких клінічних проявів хвороби при первинному зараженні не виникає і людина довгі роки не підозрює, що хворіє, але при цьому є джерелом зараження.

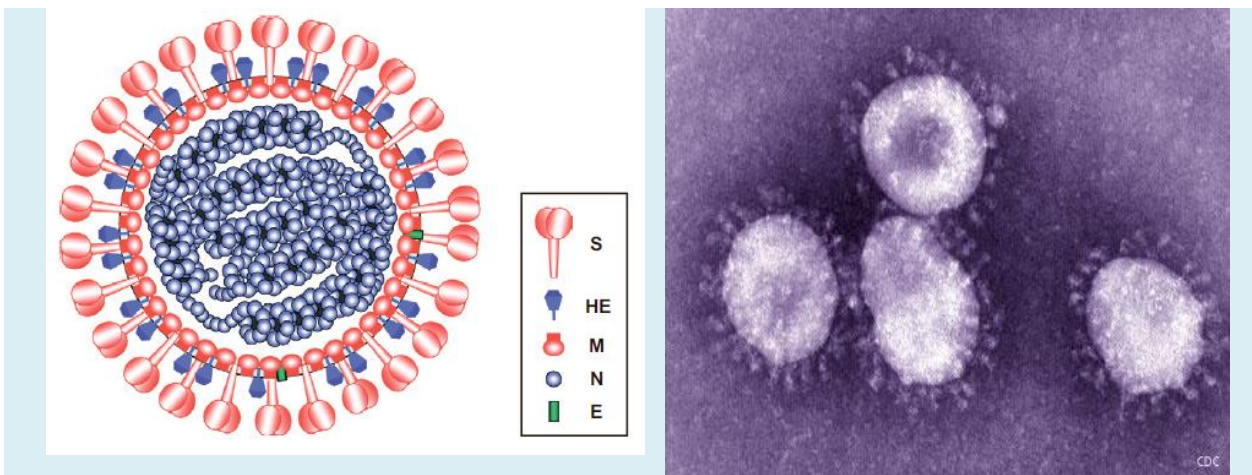
Часто люди дізнаються про те, що вони є переносником вірусу гепатиту С при здачі аналізу крові протягом звичайного медичного обстеження або при спробі здати кров в якості донора. Багато людей живуть від 20 до 40 років з вірусом і не стають серйозно хворими, і у них не розвивається печінковий недостатності. Проте хронічна форма хвороби нерідко переходить в цироз і рак печінки. Хронічний перебіг розвивається приблизно у 90% дорослих хворих і до 20% – у хворих дітей.

7.4.3. Родина *Coronaviridae*

Геном представлений несегментованою одноланцюговою (+)РНК.

Віріони мають оболонку і прикрашені довгими, 15–20 нм, виступами, які утворюють щось на кшталт корони. Через них ця родина і дістала свою назву. Віріони плеоморфні і мають розмір 70–200 нм по різних осях. Нуклеокапсид має спіральну симетрію і складається з РНК, зв'язаною з множинними копіями єдиного фосфопротейну (мал. 7.9).

У людей коронавіруси викликають переважно ОРЗ, вражаючи верхні дихальні шляхи. Найвідоміший коронавірус – збудник атипової пневмонії, який є причиною важкого захворювання.



Мал. 7.9. Віріон вірусів родини *Coronaviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. S – білок, з якого побудовані виступи; HE – гемаглютинин-естераза (її мають окремі групи коронавірусів), M – інтегральний глікопротеїн мембрани; E – білок оболонки, який є мінорним структурним компонентом і присутній у кількості близько 20 молекул на віріон; N – білок нуклеокапсиду, який зв'язується з одноланцюговою РНК.

7.4.4. Родина *Togaviridae*

Геном тогавірусів являє собою несегментовану одноланцюгову (+)РНК, що має кеп на 5'-кінці і полі(A) хвіст на 3'-кінці. Віріони мають оболонку і утворюють сферичні частки діаметром 65–70 нм, з виступами глікопротеїну. Нуклеокапсиди мають ікосаедричну симетрію, побудовані з 240 мономерів (T=4) (мал. 7.10).



Мал. 7.10. Віріон вірусів родини *Togaviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів.

Родина включає два роди: *Alphavirus* і *Rubivirus*.

Альфовіруси викликають захворювання тварин і людини. Переносники вірусів і резервуари інфекції – членистоногі (комарі і кліщі), які трансваріально передають їх потомству, а також примати. Прояв захворювання сезонний, осередковий. Патогенез і клініка альфовірусних інфекцій різноманітний. Це – або лихоманка (Синдбіс, Карельська, Чикунгунья, О'Ньон-Ньонг, лісу Семлики) з більш-менш вираженими ураженнями внутрішніх органів (печінка, селезінка), іноді з появою висипів, або важкі форми енцефаломієлітів (Східний, Західний, Венесуельський).

До рубівірусів належить збудник краснухи (лат. rubella) – епідемічного вірусного захворювання з інкубаційним періодом близько 15–24 діб. Після інкубаційного періоду з'являється помірна температура з головним болем, фарингітом, кон'юнктивітом, висипаннями. Це зазвичай досить безпечне захворювання, що зачіпає в основному дітей, але воно може спровокувати серйозні вроджені вади, якщо жінка заражається на початку вагітності.

Джерелом інфекції є тільки людина. Це або хворі клінічно вираженою формою краснухи, або особи, у яких краснуха протікає атипово, без висипу, а також діти з природженою краснухою, в організмі яких вірус може зберігатися протягом багатьох місяців (до 1,5 років і більше). До введення в практику активної імунізації краснуха зустрічалася у вигляді епідемічних спалахів з інтервалом 6–9 років. Введення щеплень проявилось в різкому зниженні захворюваності. Наприклад, в США в 1964 р. зареєстровано більше 1,8 млн. хворих краснухою, причому в результаті природженої краснухи народилося понад 20000 дітей з аномаліями розвитку. У 1984 р. краснухою захворіло всього 745 чоловік.

Вірус краснухи при природній інфекції проникає в організм через слизові оболонки дихальних шляхів. Надалі настає віремія. З кров'ю вірус розноситься по усьому організму, має дерматотропні властивості, викликає зміни лімфатичних вузлів, які збільшуються вже у кінці інкубаційного періоду. Антитіла в сироватці з'являються через 1–2 дні після висипання. Надалі титр їх наростає. Після перенесеного захворювання антитіла зберігаються протягом усього життя. Імунітет стійкий довічний.

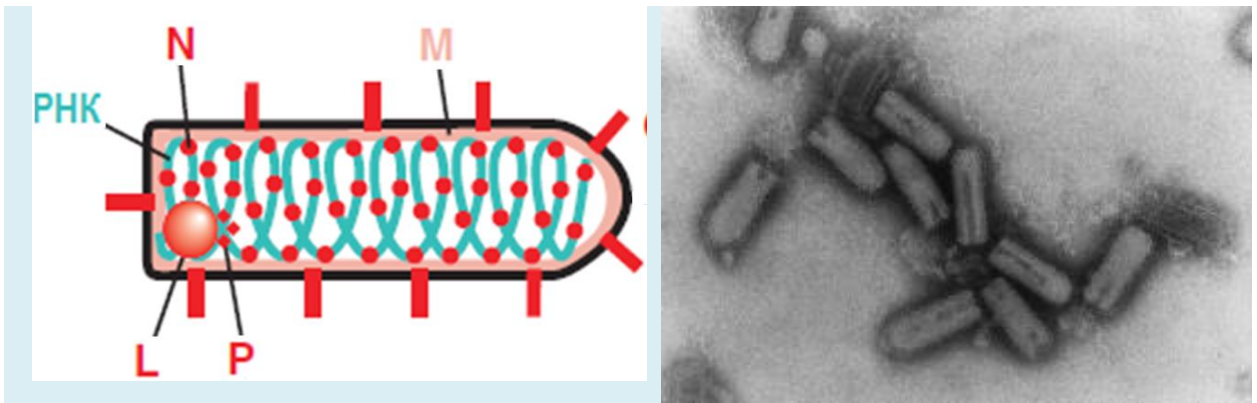
Вірус краснухи має тропізм до ембріональної тканини, значно порушує розвиток плоду. Частота поразок плоду залежить від термінів вагітності. Захворювання краснухою на 3-4-му тижнях вагітності обумовлює природжене каліцтво в 60% випадків, на 9-12-му тижні – в 15% і на 13-16-му тижні – в 7% випадків. При захворюванні вагітних краснухою під час віремії вірус потрапляє в плаценту, там розмножується і інфікує плід. Інфекція викликає порушення мітотичної активності, хромосомні зміни, що призводить до відставання у фізичному і розумовому розвитку. При природженій краснусі, незважаючи на наявність в сироватці крові антитіл до вірусу краснухи, збудник тривалий час (до 31 місяця) зберігається в організмі дитини. Дитина протягом усього цього часу може бути джерелом інфекції для інших дітей.

7.5. Віруси, що містять мінус-ланцюг РНК

7.5.1. Родина *Rhabdoviridae*

Рабдовіруси мають геном, що містить (–)РНК розміром 11–15 т.н. Назву ці віруси дістали від грецького слова *rhabdos*, яке означає паличка. Віріони деяких рабдовірусів, особливо тих, які вражають рослини, має форму палички із закругленими кінцями, тоді як інші рабдовіруси, в основному ті, які вражають тварин, мають форму кулі з рушницею.

Віріони рабдовірусів покриті оболонкою, нуклеокапсид має спіральну симетрію (мал. 7.11).

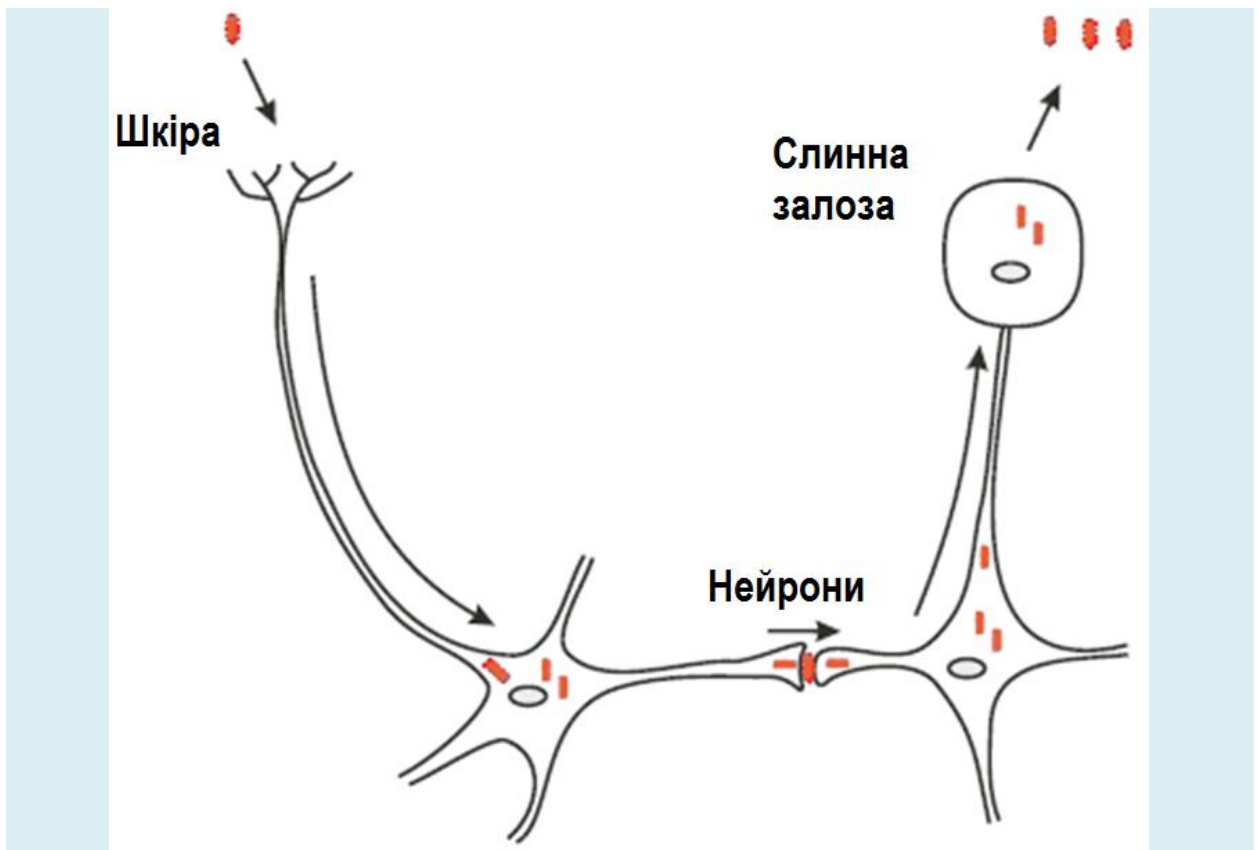


Мал. 7.11. Віріон вірусів родини *Rhabdoviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. Усі рабдовіруси містять у віріоні п'ять білків: нуклеопротеїн покриває РНК, формуючи нуклеокапсид зі спіральною симетрією. З нуклеокапсидом пов'язані білки Р (фосфопропротеїн) і L (large) – великий білок. Білок матриксу М утворює шар між нуклеокапсидом і оболонкою віріона, і глікопротеїн G у вигляді тримерів проникає через оболонку і формує виступи.

Рабдовіруси вражають багатьох хазяїв, що належать до тварин і рослин. Багато рабдовірусів мають широке коло хазяїв, і наприклад рабдовіруси рослин можуть здійснювати реплікацію як в рослині, так і в комасі-переноснику.

Двома важливим представником цієї родини є вірус сказу. Він, як і багато інші рабдовіруси, має виключно широке коло хазяїв. У природі цей вірус заражає дуже багато видів ссавців, а в умовах лабораторії можуть також бути заражені птахи і лінії клітин рептилій і комах.

Вірус сказу викликає специфічний енцефаліт (запалення головного мозку) у тварин і людини. Передається із слиною при укусі хворою твариною. Вірус, який міститься в слині, через пошкоджену шкіру дістає доступ до нервових клітин (мал. 7.12). Потім, поширюючись по нервових шляхах, вірус досягає слинних залоз і нервових клітин кори головного мозку, гіпокампу, бульбарних центрів, і, вражаючи їх, викликає важкі безповоротні порушення.



Мал. 7.12. Шлях вірусу сказу в тілі тварини.

Щороку сказ вбиває значне число людей, собак, великої рогатої худоби і інших видів тварин. Точні цифри не відомі, але за оцінками, сказ щорічно вбиває більше 60000 людей. Більшість заражень людини відбуваються через укуси скажених собак.

У багатьох регіонах світу основним резервуаром вірусу сказу служить єдиний вид тварини; наприклад в Західній Європі це руда лисиця, а в Австралії кажани.

7.5.2. Родина Orthomyxoviridae

Геном ортоміксовірусів складається з сегментів одноланцюгової лінійної (–)РНК. Кількість сегментів залежить від виду вірусу і складає вісім у вірусів грипу А і В і сім у вірусу грипу С.

Віріони покриті оболонкою, сферичні або плеоморфні, діаметром 80–120 нм. Кожен сегмент геномної РНК формує нуклеокапсид, що має спіральну симетрію. На поверхні віріона є виступи глікопротеїнів і неглікозильованих білків завдовжки 10–14 нм (мал. 7.13).

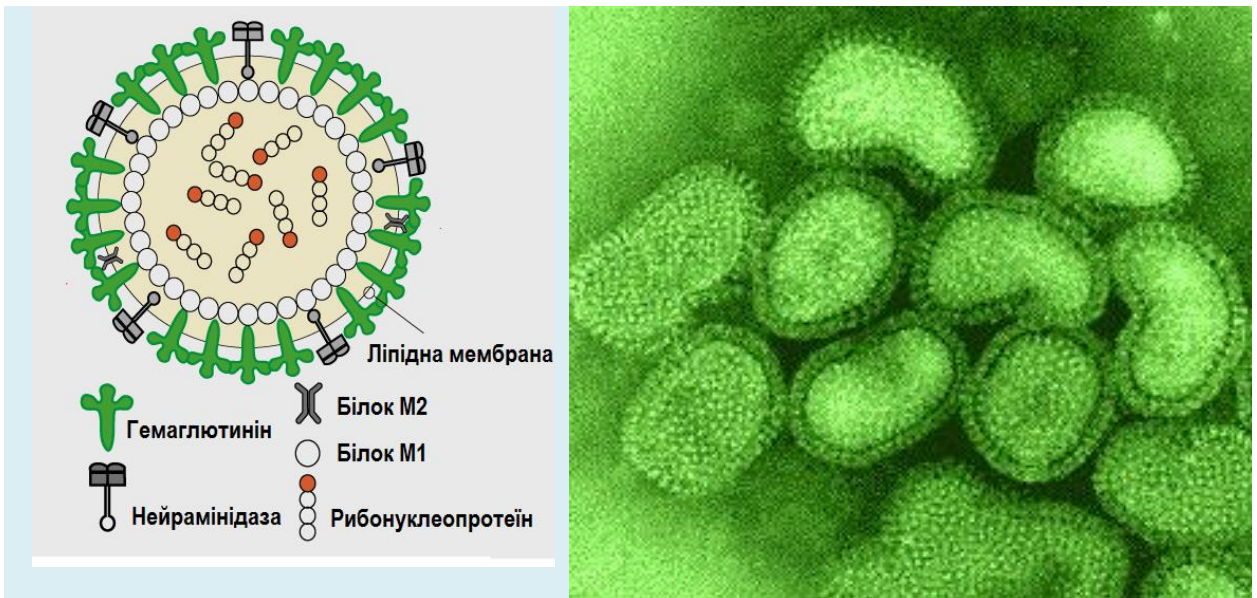
До родини *Orthomyxoviridae* належать п'ять родів, з яких найбільш важливими є:

Вірус грипу А (Influenzavirus A)

Вірус грипу В (Influenzavirus B)

Вірус грипу С (Influenzavirus C)

Приналежність вірусу грипу до типу (роду) А, В або С визначається антигенними властивостями внутрішніх білків віріона (М1 і NP).



Мал. 7.11. Віріон вірусів родини *Orthomyxoviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів.

Віруси типу А і В викликають щорічні епідемії грипу, вірус грипу С викликає слабкі симптоми або протікає безсимптомно, зустрічається рідко і епідемії не викликає.

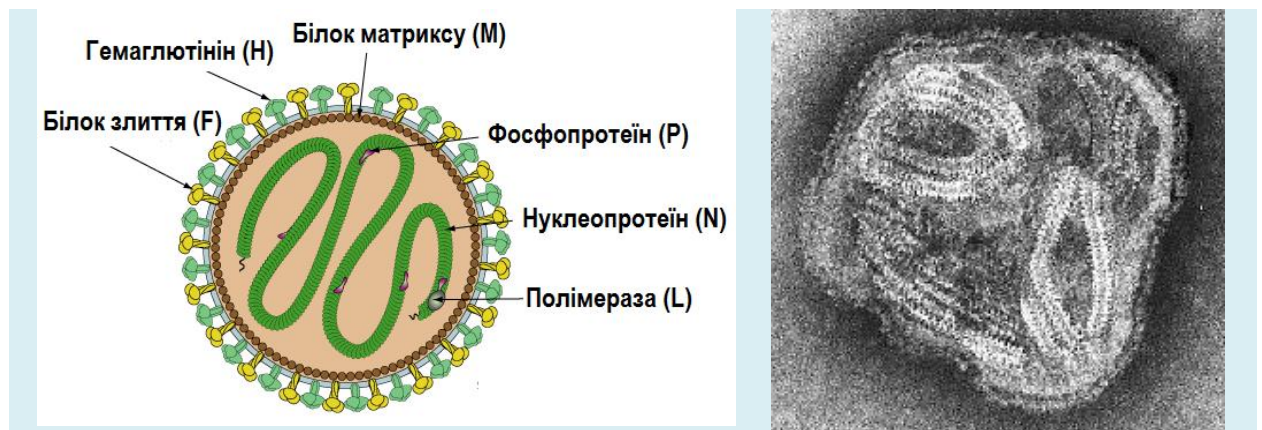
Вірус типу А здатний заражати як людей, так і тварин. Цей тип вірусу постійно видозмінюється і провокує великі епідемії грипу. Вірус грипу В поширюється тільки серед людей, але викликає менш важку реакцію, ніж тип А, і не викликає пандемій. Вірус грипу С уражає тільки людей і не викликає важких симптомів і епідемії.

Проникнувши у верхні дихальні шляхи, вірус грипу вражає слизову оболонку, розмножуючись в епітеліальних клітинах. Виникає дистрофія клітин циліндричного епітелію, знижується бар'єрна функція слизової оболонки. Коли вірус грипу потрапляє у кров, це спричиняє розвиток загального токсикозу. За інтоксикацію відповідальні ліпіди оболонки вірусу. Токсична дія проявляється у вигляді підвищення температури, ознобу, міальгій (болів у м'язах), головного болю. За оцінками, щороку на земній кулі від грипу помирає до 500000 чоловік.

7.5.3. Родина Paramyxoviridae

Геном являє собою несегментовану одноланцюгову лінійну (–)РНК.

Віріони покриті оболонкою, сферичні або плеоморфні, діаметром 150 нм або більше. Нуклеокапсид має спіральну симетрію. Довжина нуклеокапсиду досягає 1000 нм у деяких родів (мал. 7.12).



Мал. 7.12. Віріон вірусів родини *Paramyxoviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія.

До сімейства належать зокрема віруси, що викликають кір, епідемічний паротит (свинку), парагрип, чуму собак.

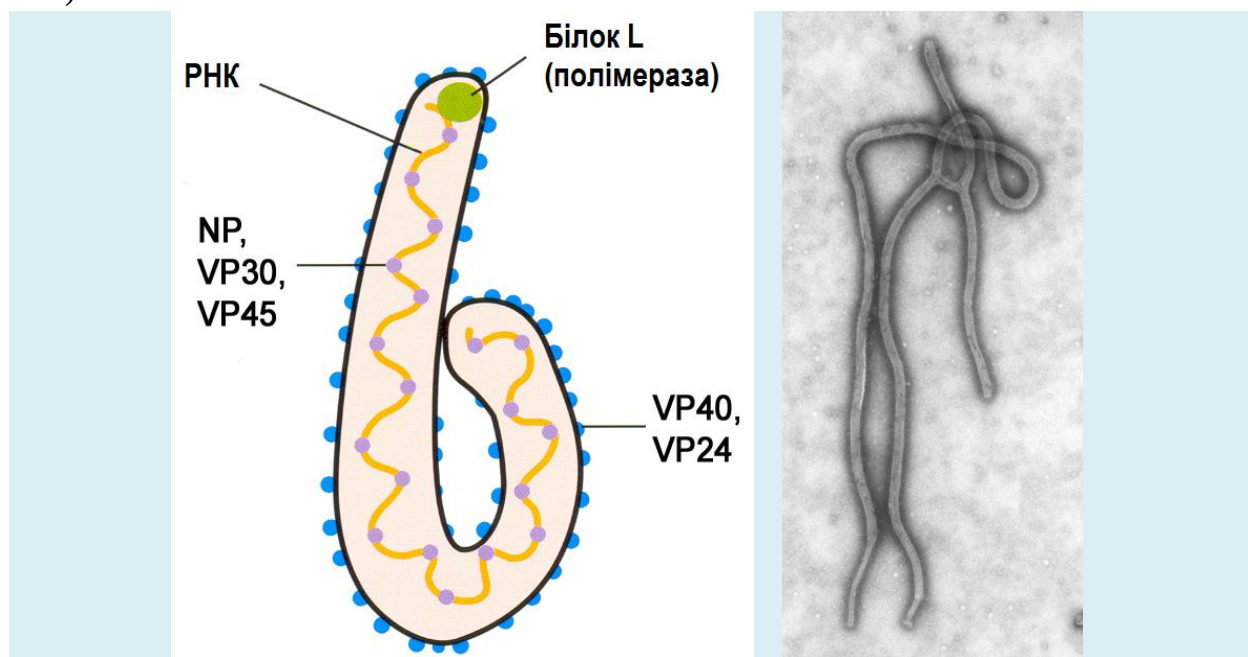
Кір – гостре інфекційне вірусне захворювання з високим рівнем сприйнятливості, яке характеризується високою температурою (до 40,5°C), запаленням слизових оболонок порожнини рота і верхніх дихальних шляхів, кон'юнктивітом і характерним плямисто-папульозним висипом шкірних покривів, загальною інтоксикацією.

Проникнення вірусу в організм людини відбувається через слизову оболонку верхніх дихальних шляхів і далі з потоком крові (первинна віремія) вірус потрапляє до ретикулоендотеліальної системи (лімфатичних вузлів) і вражає усі види білих кров'яних клітин. Після розмноження в лімфатичних вузлах вірус знову потрапляє в кров, розвивається повторна (вторинна) віремія, з якою пов'язаний початок клінічних проявів хвороби. Вірус кору пригнічує діяльність імунної системи (можливе безпосереднє ураження Т-лімфоцитів), відбувається зниження імунітету і як наслідок розвиток важких вторинних, бактерійних ускладнень з переважною локалізацією процесів в органах дихання.

Вірус кору є однією з головних причин дитячої смертності в країнах, що розвиваються, і є відповідальним за деяку частину дитячої смертності в розвинених країнах.

7.5.4. Родина *Filoviridae*

Геном вірусів цієї родини представляє собою несегментовану одноланцюгову лінійною (–)РНК. Віріони покриті оболонкою, паличкоподібні або ниткоподібні, іноді виглядають розгалуженими, сильно варіюють по довжині. Нуклеокапсид має спіральну симетрію (мал. 7.13).



Мал. 7.13. Віріон вірусів родини *Filoviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія вірусу Ебола.

До родини належать віруси Марбург і Ебола, які викликають захворювання з високою летальністю (див. розділ 7.7).

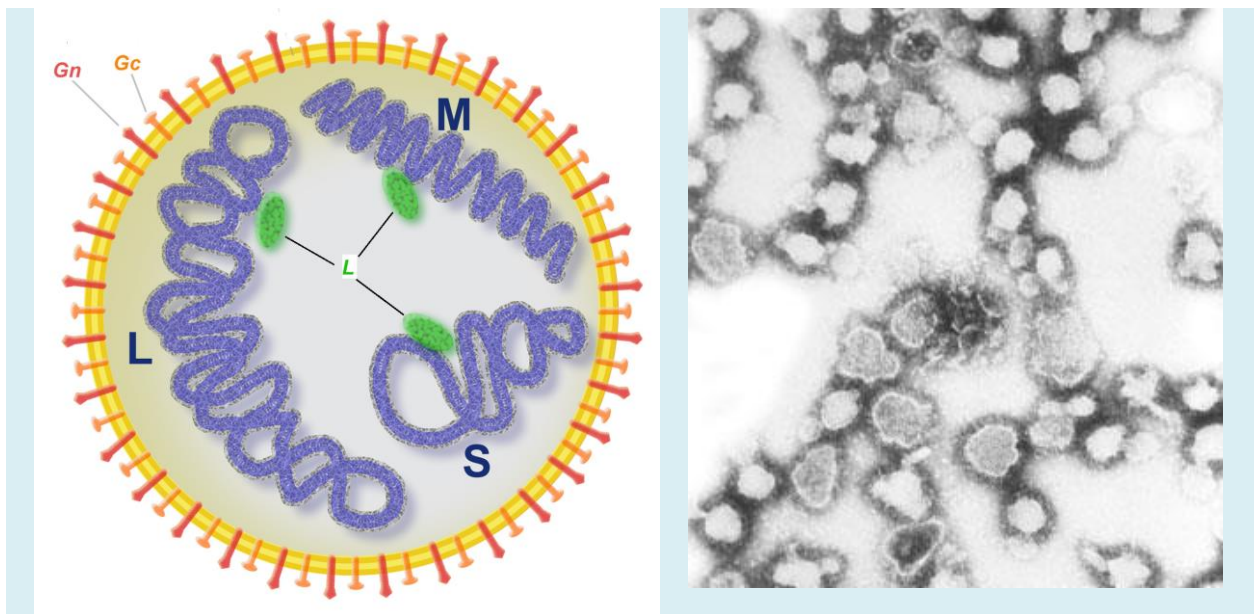
7.5.5. Родина *Bunyaviridae*

Геном представлений трьома сегментами лінійної (–)РНК, які за рахунок спаровування

останніх азотистих основ утворюють нековалентно замкнуті кільця. Сегменти позначають як великий L (large), середній M (medium) і малий S (small).

Віріони мають оболонку, сферичні або поліморфні, 80–120 нм діаметром, покриті глікопротеїнами, що виступають. Нуклеокапсид зазвичай (але не завжди) має спіральну симетрію (мал. 7.14).

До родини належить рід *Hantavirus*, зокрема вірус Сін Номбре (Sin Nombre, див. розділ 7.7), а також вірус геморагічної лихоманки Крим-Конго, що належить до роду *Nairovirus*. Це гостре інфекційне захворювання людини, що передається через укуси кліщів. Захворювання характеризується лихоманкою, вираженою інтоксикацією і крововиливами на шкірі і внутрішніх органах. Уперше виявлено в 1944 році в Криму. Збудник виявлений в 1945-му. У 1956 році в Конго було виявлено схоже захворювання. Дослідження вірусу встановили його повну ідентичність з вірусом, виявленим в Криму.



Мал. 7.14. Віріон вірусів родини *Bunyaviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія. Gc і Gn – глікопротеїни, що виступають над оболонкою, L, M і S – сегменти РНК, L – білок-репліказа.

Природний резервуар збудника – гризуни, велика і дрібна рогата худоба, птахи, дикі види ссавців, а також самі кліщі, здатні передавати вірус потомству через яйця, і які є вірусоносіями довічно. Джерело збудника – хвора людина або інфікована тварина. Вірус передається при укусі кліща, або при проведенні медичних процедур, пов'язаних з ін'єкціями або забором крові. Спалахи захворювання спостерігаються на території Росії в Краснодарському і Ставропольському краю, Астраханській, Волгоградській і Ростовській областях, в республіках Дагестан, Калмикія і Карачаєво-Черкесії. Захворювання також зустрічається на півдні України, в країнах південної Європи, Центральної Азії, Китаї, Центральній, Східній і Південній Африці (Конго, Кенія, Уганда, Нігерія та ін.). Смертність серед хворих варіює від 2 до 50%.

7.5.6. Родина *Arenaviridae*

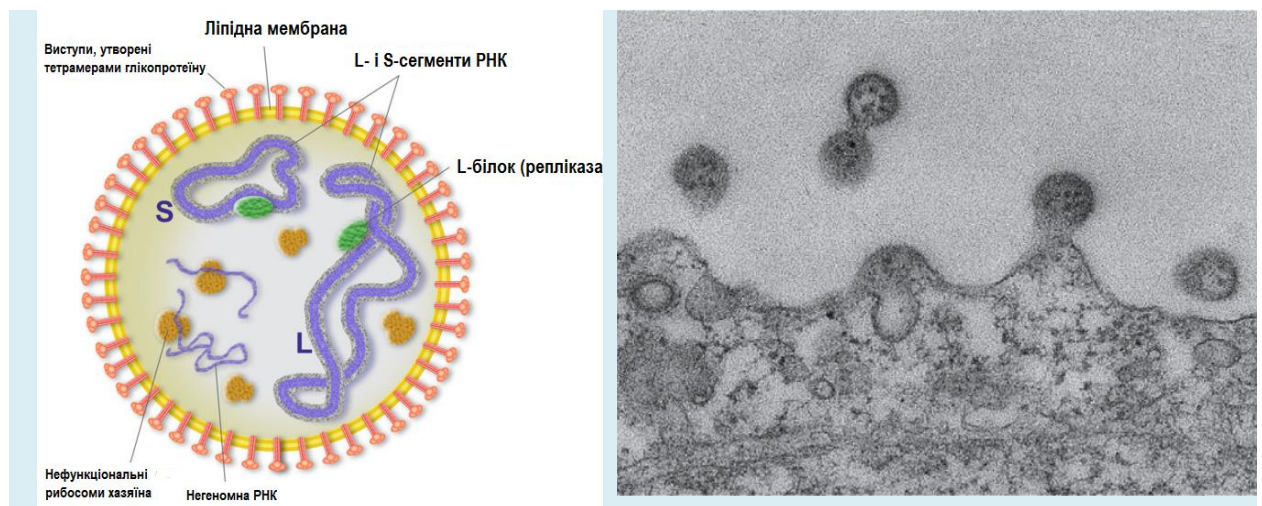
Геном представлений двома сегментами лінійної РНК, які позначають як великий L (large) і малий S (small). Крім того, у віріоні містяться негеномні РНК клітини-хазяїна. Зазвичай аренавіруси розглядають як віруси з (–)РНК, але фактично їх геномна РНК амбісен-

сова (двозначна), тобто частина кожного сегменту геномної РНК вірусів є комплементарною відповідним мРНК, а інша частина має послідовність нуклеотидів, яка співпадає з послідовністю мРНК.

Віріони покриті ліпідною мембраною, мають щільно розташовані великі виступи на поверхні. Форма округла або плеоморфна, діаметр віріонів 50–300 нм. Два нуклеокапсида мають форму кілець і ймовірно представлені суперспіральними структурами з лінійною організацією нуклеосомних субодиниць. Крім того, у віріон пакується різна кількість нефункціональних рибосом клітини-хазяїна (мал. 7.15).

Ареनावіруси умовно ділять на віруси Старого Світу і Нового Світу.

Серед чотирьох вірусів Старого світу виділяють вірус лімфоцитарного хоріомеїнігіту, що зустрічається у гризунів по всьому світу, а також вірус лихоманки Ласса. Хвороба вперше описана у 1969 році в м. Ласса у медсестри місіонерського госпіталю, а потім і в м. Джосе (Нігерія), хоча і до цього в Західній Африці була описана хвороба з подібними проявами під назвою "тропічний висипний тиф". Надалі спалахи цієї хвороби спостерігалися в С'єрра-Леоне і Ліберії. Існування вогнищ інфекції серологічно доведено й в інших країнах Африки (Берег Слонової Кістки, Гвінея, Малі, Мозамбік, Сенегал та ін.). Летальність досягала 36–67%. В наступні роки лихоманка Ласса неодноразово зустрічалася в ряді країн Європи і Америки у медичного персоналу внаслідок зараження від хворих, які прибули із Західної Африки.



Мал. 7.15. Віріон вірусів родини *Arenaviridae*. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів, які відбруньковуються від поверхні клітини хазяїна.

Віруси Нового світу зустрічаються у щурів в Південній Америці. До них належать віруси Хунін (збудник аргентинської геморагічної лихоманки), Мачупо (збудник болівійської геморагічної лихоманки) і Гуанаріто (збудник венесуельської геморагічної лихоманки).

Основний резервуар ареनावірусів – різні гризуни. Для вірусів цієї родини характерна тривала персистенція в інфікованих тваринах; він виділяється із сечею, слиною, виявлений у секреті респіраторного тракту. Протягом тривалого часу зберігається у висохлих виділеннях. Гризун часто проникає в житла людей і забруднює своїми виділеннями продукти та інші предмети. Зараження людини може відбуватися аліментарним і повітряно-пиловим шляхом. Хвора людина також стає джерелом збудників інфекції і становить велику небезпеку для оточуючих. Вірус виявлений у крові, виділеннях (кал, блювотні маси, сеча), кра-

пельках слини, а виділення вірусу хворими може продовжуватися до одного місяця і більше. Зараження може відбуватися повітряно-крапельним шляхом, а також при попаданні на шкіру (через мікротравми) крові або виділень хворого. Так інфікуються медичні працівники, що доглядають за хворими, і працівники лабораторій при дослідженні матеріалу від хворих.

Смертність досягає 70% хворих.

7.6. Віруси, реплікація яких відбувається через стадію зворотної транскрипції

7.6.1. Родина *Retroviridae*

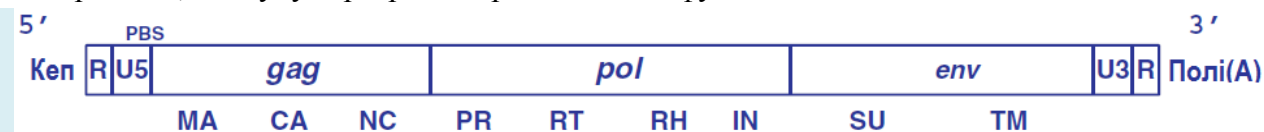
Родина включає дві підродини: *Orthoretrovirinae* і *Spumaretrovirinae*.

Геном у представників підродини *Orthoretrovirinae* складається з двох копій одноланцюгової (+)РНК. Ці дві копії утримуються разом водневими зв'язками; окрім цього, з кожною молекулою РНК через спаровування комплементарних основ сполучена молекула тРНК хазяїна, яка служитиме праймером при синтезі ДНК.

У підродини *Spumaretrovirinae* геном являє собою дволанцюгову ДНК; точна структура цієї ДНК залишається невизначеною. Може викликати здивування, чому до однієї родини вірусів віднесені дві підродини, які мають різні геномні нуклеїнові кислоти (РНК або ДНК). Це пов'язано з тим, що фактично ці підродини є спорідненими і їх цикли реплікації схожі (розділ 4.3.3.1). Але віріони підродини *Orthoretrovirinae* мають геномні (+)РНК, і зворотна транскрипція у родини трапляється після проникнення вірусу в клітину. А у підродини *Spumaretrovirinae* зворотна транскрипція відбувається до вивільнення віріонів з ураженої клітини, тому віріони цієї підродини і містять ДНК. Можна сказати так, що віріони цих споріднених підродин містять генетичний матеріал, який репрезентує зсуnutí за фазою етапи циклу реплікації нуклеїнової кислоти.

Віріони покриті ліпідною оболонкою, сферичні, діаметром 80–100 нм. На поверхні віріонів є виступи глікопротеїнів завдовжки 8 нм. У центрі віріона знаходиться ядро (кор), що являє собою нуклеокапсид, форма якого варіює від сферичної до паличкоподібної і конусної у різних родів.

Геном ретровірусів містить стандартний набір генів (*gag*, *pol*, *env*, мал. 7.16), які кодують поліпротеїни, що будуть розрізані протеазами на функціональні білки.



Мал. 7.16. Організація геному ретровірусів. Гени носять назву *gag* (**g**roup-specific **a**ntigen), *pol* (**p**olymerase) і *env* (**e**nvelope). Головними білками, які кодують ці гени, є білки матриксу MA, капсиду CA, нуклеокапсиду NC, протеази PR, зворотної транскриптази RT, РНКазы Н RH, інтегрази IN, глікопротеїн поверхні SU, трансмембранний глікопротеїн TM. Геном також містить некодуючі послідовності PBS (сайт приєднання праймера), прямі повтори R, унікальну послідовність на 3'-кінці U3 і унікальну послідовність на 5'-кінці U5.

Окрім стандартного набору генів, ретровіруси можуть мати додаткові гени. Наприклад, в деяких випадках додається один ген, названий онкогеном, оскільки його експресія може приводити до перетворення клітини хазяїна в пухлинну клітину. Прикладом онкогена є ген *src* в геномі вірусу саркоми Рауса, що заражає курей. Ретровіруси можуть мати і інші гени, продукти яких виконують різноманітні функції в циклі реплікації вірусу.

Родина *Retroviridae* містить 7 родів, приклади представників яких наведені в таблиці нижче.

Рід	Представники	Рід	Представники
<i>Alpharetrovirus</i>	Вірус саркоми Ра-у-су	<i>Deltaretrovirus</i>	Т-лімфотропні віруси людини 1 і 2
<i>Betaretrovirus</i>	Вірус раку молочних залоз мишей	<i>Epsilonretrovirus</i>	Вірус лейкоми порі-вки
<i>Gammaretrovirus</i>	Вірус лейкемії мишей	<i>Lentivirus</i>	Вірус імунodefіциту людини
<i>Sputavirus</i>	Пінистий вірус шимпанзе		

Особливістю підродини *Sputavirinae* ("пінисті віруси") є їх здатність викликати своєрідний ефект, що проявляється злиттям клітин. Культура клітин, уражених цими вірусами, виглядає як би спіненою, звідси їх назва – "пінисті". Віруси поширені всюди, екзогенні, знайдені у багатьох ссавців. У 1960–1970-х рр. віруси цієї підродини були виділені від мавп, людини, кішки, хом'яка, бика та ін. Хоча в природних умовах представники *Sputavirinae* рідко викликають хворобу у своїх хазяїв, але вони здатні викликати нейродегенерацію, коли їх експресують як трансген у мишей, і можуть інфікувати різні види ссавців, у тому числі людей. Природного інфікування людей не зареєстровано, відзначалися окремі випадки зараження людей від нелюдиноподібних мавп. Стосунку спумавірусів до якоїсь відомої патології доки не встановлено, в той же час потрібно розуміти і те, що вони існують завдяки ресурсам клітини.

7.6.1.1. Ендогенні ретровіруси

Впродовж деякого часу було відомо, що геноми хребетних тварин містять ретровірусні послідовності. Нині в геномі людини виявлені майже 100000 ретровірусних послідовностей; їх виявляють в кожному новому виді, геном якого секвенують. Послідовності більшості цих ендогенних ретровірусів є дефектними.

Деякі з цих послідовностей близько споріднені з нормальними ретровірусами. Є дуже вірогідним, що ці ретровірусні послідовності виникли при зараженні ретровірусом зародкової лінії клітин, тобто сперматозоїдів і/або яйцеклітин. Час від часу ендогенні ретровіруси копіюють самі себе в інші частини генома, створюючи родини споріднених ендогенних ретровірусних елементів.

Оскільки ендогенні ретровірусні послідовності дефектні, вони не можуть нормально реплікуватися. Проте в деяких випадках реплікація може відбуватися. Порушену функцію одного ретровірусу може доповнити послідовність іншого ретровірусу або екзогенного ретровірусу, який заразив клітину. Деякі ендогенні ретровіруси не можуть реплікуватися в клітинах видів, в яких вони зустрічаються, але починають реплікуватися в клітинах інших видів; наприклад, деякі ендогенні ретровіруси мишей і свиней реплікуються в клітинах людини. Деякі ендогенні ретровіруси не є дефектними, він мають повний геном і можуть ініціювати продуктивну інфекцію.

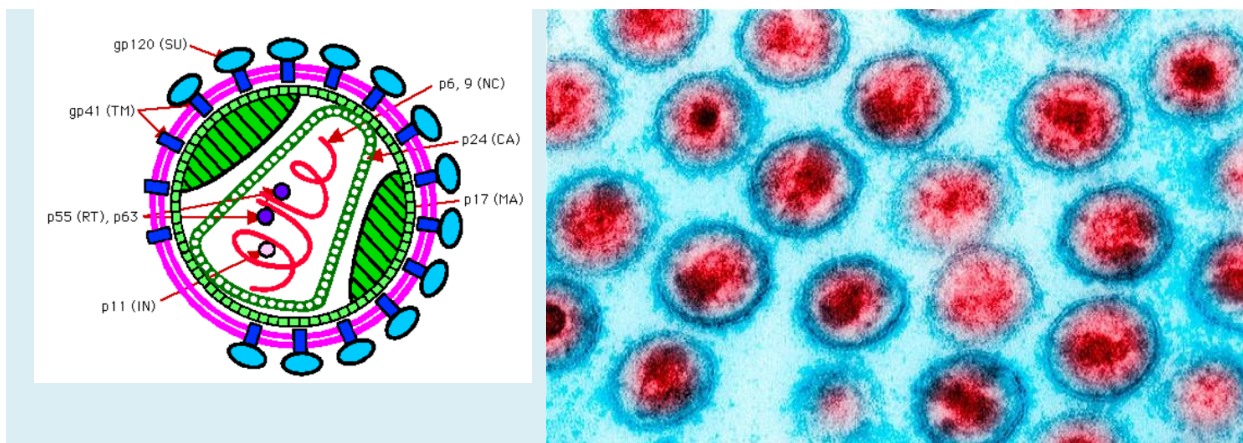
7.6.1.2. Вірус імунodefіциту людини

Є два типи вірусу імунodefіциту людини – ВІЛ-1 і ВІЛ-2. Їх походження пов'язане з двома різними вірусами імунodefіциту мавп (ВІМ). ВІМ не є небезпечним для своїх хазяїв-приматів, але ВІЛ руйнує імунну систему, внаслідок чого тіло людини стає сприйнятливим до зараження широким колом бактерій, вірусів, грибів і протистів. Такий стан зветься синдромом надбаного імунodefіциту (СНІД). Слід звернути увагу, що неправильно буде сказати "вірус ВІЛ", оскільки тут слово вірус є зайвим. Не слід також говорити "вірус СНІДу" або "заражений СНІДом".

ВІЛ-1 поширений значно ширше, ніж ВІЛ-2; саме ВІЛ-1 відповідальний за пандемію

СНІДу. Поширеність ВІЛ-2 обмежується Західною Африкою. За оцінками, Нині щороку в середньому відбуваються 5 млн. нових випадків зараження ВІЛ, і приблизно 5 млн. смертей від СНІДу, який став четвертою по важливості причиною смерті у людей. Небезпека цієї проблеми привела до виділення величезних ресурсів на розробку противірусних препаратів і вакцини. Певний успіх був досягнутий в розробці противірусних препаратів, надійну вакцину створити доки не вдалося.

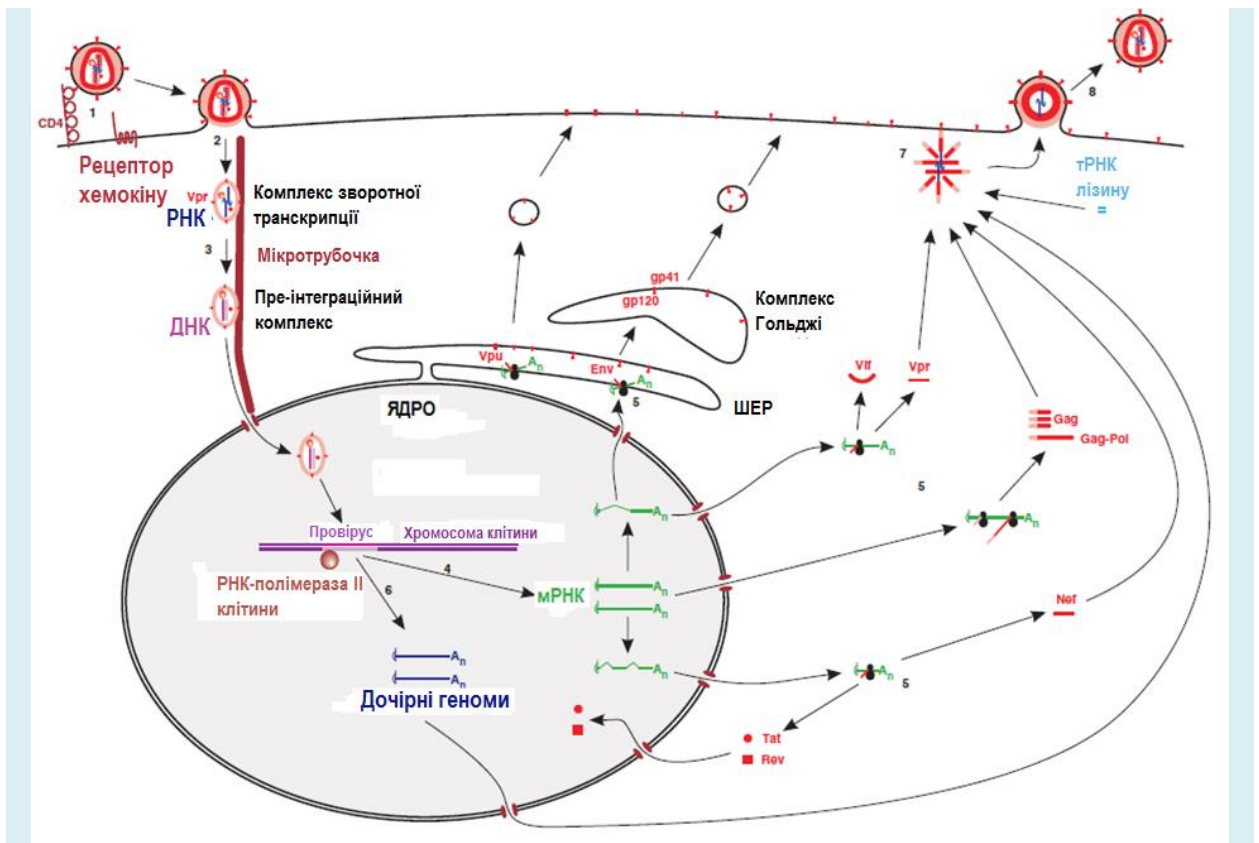
Віріон ВІЛ має усі особливості віріонів ретровірусів, проте, на відміну від більшості ретровірусів, нуклеокапсид має конусну форму, з діаметром 40-60 нм на широкому кінці і 20 нм у вузькому кінці (мал. 7.17). Зазвичай у віріоні буває один капсид, хоча спостерігали віріони з двома і більше капсидами. Загальний діаметр віріона складає 80-110 нм.



Мал. 7.17. Віріон ВІЛ. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. МА – білки матриксу, СА – білки капсиду, NC – нуклеокапсид, SU – глікопротеїни поверхні, ТМ – трансмембранні глікопротеїни, RT – зворотна транскриптаза, IN – інтеграза.

Геном ВІЛ, окрім типових для усіх ретровірусів генів (мал. 7.16), має низку додаткових генів, продукти яких грають допоміжну роль при реплікації вірусу. Загальна схема реплікації ВІЛ показана на мал. 7.18.

На етапі прикріплення (1) рецепторами клітини для ВІЛ-1 є білки CD4, які знаходяться на поверхні клітин декількох типів, включаючи Т-хелперні клітини і деякі макрофаги; основною мішенню є CD4 Т-лімфоцити.



Мал. 7.18. Головні етапи реплікації ВІЛ. Пояснення див. в тексті.

Після зв'язування з рецептором, віріон ВІЛ також повинен зв'язатися з корецепторами на поверхні клітини. Корекцепторами служать рецептори хемокинів⁸.

При імунній відповіді ці рецептори зв'язують хемокини, і ця взаємодія контролює переміщення лейкоцитів і диференціювання Т-лімфоцитів. Хемокини за своєю структурою розподіляються на два головні класи, і для кожного з класів є свій рецептор, а саме CCR і CXCR.

Більшість штамів ВІЛ-1 як корекцептор використовують CCR5, і їх позначають як штами R5. Цікаво, що у деяких людей, які багаторазово піддавалися дії вірусу, але не заразилися, є делеція в гені CCR5. У гомозигот по цій мутації рецептор CCR5 не експресується, і їх клітини високо стійкі до зараження ВІЛ-1. Ця мутація виявлена головним чином у жителів Європи.

Штами ВІЛ-1, які використовують як корекцептор CXCR4, називають штамми X4; є також невелика кількість штамів, які можуть використати будь-який з корекцепторів. Ці штами означають як R5X4. Штами R5 не можуть заражати наївні Т-лімфоцити, але усі три штами заражають Т-клітини імунологічної пам'яті.

Взаємодія білку вірусу gp120 з рецептором і корекцепторами призводить до змін конформації білку gp41, в результаті яких відбувається злиття мембран клітини і вірусу (2) і вміст

⁸ Хемокини (англ. chemokines) – родина невеликих цитокінів, що виділяються клітинами хребетних. Хемокини об'єднує їх невеликий розмір (від 8 до 10 кДа) і наявність 4 консервативних цистеїнів, що є ключовими амінокислотами, які визначають тривимірну структуру білку. Хемокини здатні викликати хемотаксис чутливих до них клітин (звідси їх назва хемотаксичні цитокіни, скорочено хемокини). Одна група хемокинів (наприклад, інтерлейкін 8) є прозапальними цитокінами і стимулює міграцію імунних клітин до місця інфікування.

віріона, що знаходиться в оболонці, вивільняється в цитоплазму. Тут формується комплекс зворотної транскрипції, що містить білки і геном вірусу. Після завершення зворотної транскрипції пре-інтеграційний комплекс, який містить білки вірусу і клітини-хазяїна, переміщається уздовж мікротрубочки до ядра (3). Як раніше було відмічено, більшість ретровірусів можуть викликати продуктивне зараження тільки у разі руйнування ядерної оболонки, тобто коли клітина-хазяїн ділиться. Проте пре-інтеграційний комплекс ВІЛ-1 може входити в ядра, що покоються, такі як ядра Т-лімфоцитів, що покоються, або макрофагів. У низки білків вірусу, що входять до складу пре-інтеграційного комплексу, виявлений сигнал ядерної локалізації.

Далі відбувається інтеграція провірусу в хромосому хазяїна. Є докази, що інтеграція провірусу в CD4 Т-лімфоцити, що покоються, може привести до латентної інфекції. Ці клітини можуть бути резервуаром інфекції в організмі, що має велике значення для виживання вірусу у людей, які одержують антивірусну терапію.

Після впровадження провірусу, в клітині відбувається експресія генів вірусу, яку підрозділяють на дві фази – ранню (4) і пізню (5). На кожній з цих фаз синтезуються свій набір білків. На завершальних етапах патогенезу синтезуються дочірні геноми (6), відбувається самозбирання вірусних часток, які не забувають прихопити лізинову тРНК хазяїна (7), і дочірні віріони вивільняються з клітини шляхом брунькування.

Незабаром після того, як людина заражається ВІЛ, відбувається значне збільшення вмісту віріонів в крові. У деяких людей в цей час спостерігається захворювання, що нагадує ангіну або грип. Імунна система хазяїна в цей період до деякої міри контролює реплікацію вірусу, і найчастіше цей період протікає безсимптомно. При відсутності застосування ліків, цей період в типовому випадку триває 8–10 років, проте він може бути і значно коротше, і значно довше, залежно від особливостей хазяїна і вірусу.

Впродовж усього безсимптомного періоду здійснюється екстенсивна реплікація вірусу, і за оцінками більше 1000 нових віріонів ВІЛ-1 продукується щодня. Інфекція виживає, незважаючи на імунну реакцію проти вірусу. Причин цьому декілька. Одна з них полягає в тому, що вірус вбиває клітини (CD4 Т-лімфоцити і макрофаги), які беруть участь в імунній відповіді. Є також дані, що неінфіковані вірусом CD4 Т-лімфоцити гинуть через індукцію апоптозу. CD4 Т-лімфоцити грають центральні ролі як хелпери різних типів клітин імунної системи, включаючи В-лімфоцити, попередники цитотоксичних Т-клітин, клітин природних кілерів і макрофагів. Таким чином, імунна реакція значною мірою виявляється порушеною.

Друга причина полягає в тому, що в ході інфекційного процесу вірус еволюціонує, утворюючи нові антигенні варіанти, які можуть не розпізнаватися антитілами і наявними Т-клітинами. Більше того, в клітинах, які містять латентну інфекцію, вірус захищений від імунної системи.

У приблизно 50% заражених людей впродовж безсимптомного періоду починають з'являтися штами ВІЛ Х4 і R5Х4; таким чином у вірусу змінюються корецептори, яким вони віддають перевагу.

Деякий час тіло людини може витримувати натиск вірусу на імунну систему, швидко замінюючи зруйновані вірусом клітини новими, але концентрація CD4 Т-лімфоцитів в крові стійко знижується і досягає точки, коли в крові різко збільшується зміст вірусних часток і розвивається СНІД. Для СНІДу характерно посилене зараження людини патогенними мікроорганізмами, також швидко можуть розвинути захворювання мозку і пухлини.

Якщо порівняти між собою ВІЛ-1 і ВІЛ-2, то для при зараженні ВІЛ-2 безсимптомній

період триває довше, прогресування хвороби відбувається повільніше.

Впродовж реплікації генома ретровірусів з високою інтенсивністю трапляються помилки, через відсутність механізму виправлення помилок при синтезі на матриці РНК. Через це ВІЛ-1 є особливо мінливим вірусом, який постійно утворює нові групи і підтипи. Варіабельна ВІЛ-1 проявляється в таких особливостях, як антигени, круг клітин, що вражаються, і стійкість до антивірусних препаратів.

Високу варіабельну проявляють антигени ВІЛ-1. Білок оболонки gp120 є особливо варіабельним. Виключно висока варіабельна цього білку ймовірно обумовлена тиском добору, який виявляється з боку імунної системи хазяїна.

Коло клітин, що вражаються вірусом, залежить від корецепторів, які потрібні для прикріплення вірусу і входу його в клітину. Встановлено, що перенесення ВІЛ-1 на нового хазяїна здійснюється майже завжди штамми R5, і цей тип штамів домінує впродовж гострої і безсимптомної фази інфекції. Потім у 50% заражених людей, у міру розвитку СНІДу, зростає доля штамів типу X4 і R5X4.

Нарешті, у випадку проведення антиретровірусної терапії, присутність ліків в організмі великого чинить тиск добору на вірус, внаслідок чого швидко виникають стійкі варіанти.

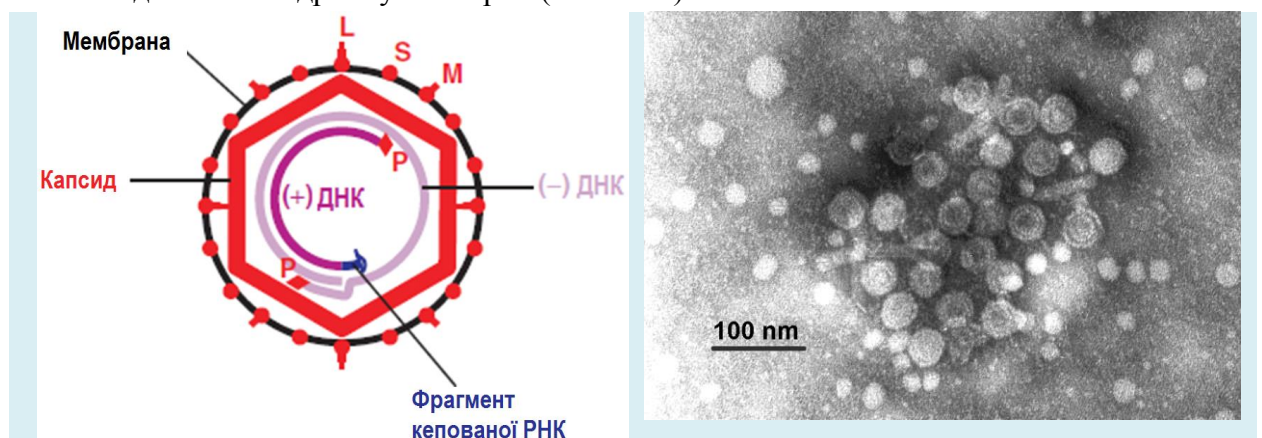
7.6.2. Родина *Hepadnaviridae*

Гепаднавіруси дістали свою назву, оскільки вони викликають гепатити і мають ДНК-геноми (HEPATic-DNA-virus).

Реплікація геномів вірусів цієї родини здійснюється через стадію зворотної транскрипції (розділ 4.3.3.2). ДНК-геномні віруси, які реплікуються через стадію РНК, відомі також у рослин. Ці віруси, разом з гепаднавірусами, дістали назву параретровіруси.

Деякі гепаднавіруси заражають комах, інші заражають птахів. З точки зору здоров'я людини, найбільше значення має вірус гепатиту В, оскільки він викликає небезпечне захворювання, яке може призвести до смерті.

Геном складається з частково дволанцюгової ДНК, яка замкнута в кільце за рахунок спаровування нуклеотидів. Неповний ланцюг (+)ДНК на 5'-кінці має ковалентний зв'язаний фрагмент РНК. Віріони покриті ліпідною оболонкою, сферичні, діаметром 42-50 нм. Нуклеокапсид має ікосаедричну симетрію (мал. 7.19).



Мал. 7.19. Віріон вірусу гепатиту В людини. Ліворуч – схема будови, праворуч – електронна мікрофотографія віріонів. S – малий білок оболонки, М – середній білок оболонки, L – великий білок оболонки, Р – полімераза (зворотна транскриптаза).

Невідомо, скільки людей заражені вірусом гепатиту В, але, за оцінками, їх близько 400 мільйонів. Більшість з них мешкає в Азії і Африці. Вірус є присутнім в крові, і шляхи його

передачі загалом схожі з ВІЛ. Щороку вірусом заражаються більше 50 мільйонів людей, в основному це діти, які отримують вірус від хворих матерів. Близько 8 мільйонів заражень щорічно відбувається через повторне використання шприців, в основному в країнах, що розвиваються.

Багато випадків зараження вірусом гепатиту В приводять до слабких симптомів хвороби або взагалі є безсимптомними, особливо у дітей. Проте при зараженні саме дітей найімовірніше перехід вірусу в персистентну форму, коли людина на багато років стає носієм вірусу. Люди, що мають персистентну інфекцію гепатиту В, можуть залишатися здоровими впродовж тривалого часу, проте в деяких випадках може розвинутися важкий гепатит, який переходить в цироз і зрештою в злоякісну пухлину печінки. З цієї причини щороку помирає близько мільйона людей.

Незвичайною особливістю інфекційного процесу, викликаного вірусом гепатиту В, є присутність в крові не лише віріонів, але також великої кількості неінфекційних часток, які вивільняються із заражених вірусом клітин. Ці частки складаються з ліпідів і білків оболонки вірусу, але вони не містять нуклеокапсиду. Ці частки можуть бути сферичної або нитчастої форми.

Віріони вірусу і неінфекційні частки набагато численніші в крові, ніж у печінці, і неінфекційні частки значно перевершують за кількістю віріони. Як відмічають, вірус очевидно має переконливу причину для продукування такої кількості неінфекційних часток, але ця причина залишається незрозумілою. Передбачається, що ці частки є свого роду підсадними качками для антитіл, переймаючи на себе їх атаку і таким чином захищаючи віріони від імунної системи хазяїна, проте остаточних доказів цьому припущенню доки немає.

На додаток до віріонів і неінфекційних часток, в крові заражених людей також знаходять розчинний вірусний білок. Цей білок відомий як е-антиген гепатиту В (HBeAg). Він подібний до білку капсиду вірусу, але має додаткові 10 амінокислотних залишків на С-термінальному кінці. Функція або функції цього білку залишається невідомою.

7.7. Віруси, що з'являються

Термін «віруси, що з'являються» (emerging virus) використовується в різних контекстах: він може означати вірус, який нещодавно виявив свою присутність за допомогою зараження нових видів хазяїв, або при появі в новій області світу, або і тим і іншим способом. Іноді вірус описують як «вірус, що з'явився знову», якщо він раніше десь був поширений, потім став рідкісним і знову збільшив поширеність.

Вірогідність появи нових вірусів збільшує діяльність людей. Подорожі і торгівля забезпечують вірусам зручну можливість потрапляти в нові області планети, а інтродукція видів тварин і рослин в нові області, наприклад овець в Австралію, надає можливість вірусам цих областей заразити нових хазяїв.

Поява нових вірусів може бути обумовлена і іншими видами діяльності, до числа яких входить тісний контакт між тваринами, включаючи полювання і використання в їжу диких приматів. Показано, що вірус імунодефіциту мавп (BIM) може бути присутнім в м'ясі приматів, і є ризик зараження при обробці такого м'яса. Перенесення BIM від мавп людині відбувалося кілька разів, і привів до появи основних груп ВІЛ-1 і ВІЛ-2; цілком імовірно, що процес появи нових вірусів людини шляхом перенесення від мавп триватиме.

Нові віруси можуть з'являтися завдяки рекомбінації, коли виникають нові життєздатні комбінації генів вірусів; саме так з'являються нові штами вірусу грипу А. Деякі «нові» ві-

руси є насправді старими вірусами, про які людство просто нещодавно дізналося, як наприклад асоційовані з саркомою Капоші герпесвіруси.

7.7.1. Віруси в нових видах хазяїв

7.7.1.1. Буньявіруси

У 1993 в регіоні південного заходу США, відомому як Чотири Кути, де сходяться штати Аризона, Нью Мехіко, Колорадо і Юта, деякі жителі почали страждати від захворювання, що нагадувало грип; у деяких з хворих виникло важке ураження легенів, і вони померли. Цей регіон США в нормі дуже сухий, проте того року були незвично сильні дощі, що привело до спалаху росту рослин і вибухового росту популяцій дрібних ссавців. Одним з цих ссавців був оленячий хом'як, вид, який притягується місцями життя людини. При дослідженнях виявилось, що багато хом'яків мали персистентну інфекцію вірусу, який виділявся з їх сечею, екскрементами і слиною. У людей, що контактували з цими речовинами, розвивалися дихальні інфекції. Вірус був охарактеризований як новий хантавірус, і хвороба дістала назву хантавірусного легеневого синдрому.

Хантавіруси належать до родини буньявірусів (*Bunyaviridae*) і дістали назву по назві річки Хантаан в Кореї, де перші віруси були виділені у солдатів, що брали участь у війні в Кореї. У солдатів розвивалася геморагічна лихоманка з нирковим синдромом (геморагічний нефрозонефрит). Схожі віруси відомі також і в інших місцях Азії і Європи.

Відносно назви вірусу, знайденого в Чотирьох Кутах, розгорнулися палкі спори. Жителі цього району не хотіли, щоб вірус був названий з використанням назви місця, де він був виділений, оскільки не хотіли, щоб туристів відштовхувала погана слава, що оточує вірус. Врешті-решт вірус назвали іспанською назвою Сін Номбре (*Sin Nombre virus*), що в перекладі означає вірус без імені.

Після 1993 року хантавірусний легеневий синдром, викликаний вірусом Сін Номбре, почав зустрічатися у багатьох частинах Північної і Південної Америки, із смертністю серед хворих близько 50%.

7.7.1.2. Параміксовіруси

Вірус Хендра

У 1994 році в тренувальному комплексі Хендра (Hendra) на околиці міста Брісбен в Австралії знаменитий в Квінсленді тренер коней Вік Райл (Vic Rail), працівники стайні і більшість коней захворіли загадковою хворобою, і впродовж декількох днів тренер і 14 коней померли. Як виявилось, коні і люди були уражені вірусом, що відноситься до родини параміксовірусів. До цієї родини відносяться добре відомі віруси, такі як вірус кору і вірус свинки, але вірус, який був виділений, раніше був невідомий. Цей вірус був названий вірусом Хендра (*Hendra virus*).

Через два роки у людини, яка жила на 800 км на північ від Хендри, стався епілептичний припадок і настав параліч. Як виявилось, він був заражений вірусом Хендра; ця людина померла від менінгоенцефаліту. З'ясувалося, що ця людина допомагала розтинати трупи двох коней 13 місяцями раніше. Тканини цих коней зберігалися, і після їх перевірки виявилось, що коні містили вірус Хендра. Таким чином, виявилось, що інфіковані люди заразилися вірусом від коней, але джерело вірусу для самих коней виявилось загадкою. Були ініційовані дослідження, і отримані докази, що вірус є присутнім в популяції кажанів, що живляться фруктами; специфічні для вірусу Хендра антитіла були виявлені в усіх чотирьох локальних популяціях кажанів роду *Pteropus*, і у одного кажана був виділений інфекційний

вірус. Мабуть, кажани є природними хазяями вірусу Хендра, при цьому зараження не викликає у них ознак хвороби. Очевидно, що час від часу трапляється передача вірусу коням, і ще рідше відбувається передача від коней людям. При цьому результат зараження коней і людей вірусом Хендра дуже відрізняється від результату зараження кажанів – при зараженні коней і людей вірус проявляє високу ступінь вірулентності з вірогідним летальним результатом захворювання.

Вірус Ніпах (Nipah virus)

У 1997 році в Малайзії з'явилося нове захворювання свиней. У хворих тварин розвивалися хвороби дихальних шляхів і енцефаліт. Пізніше у працівників свиноферм, де були зареєстровані хворі тварини, почав розвиватися енцефаліт. Впродовж дворічного періоду було зареєстровано декілька сотень випадків захворювання, при цьому померли більше 100 людей. У 1999 році з мозку одного з померлих був виділений новий вірус. Вірус виявився параміксовірусом, який мав особливості, подібні до вірусу Хендра; обидва віруси віднесені до одного роду *Henipavirus*. Виявлений вірус був названий вірусом Ніпах (Nipah virus), по назві селища, в якому він проявився. У спробі стримати спалах інфекції, було знищено більше мільйона свиней. Пошук природного резервуару інфекції виявив, що, як і з вірусом Хендра, джерелом вірусу є кажани роду *Pteropus*, що живляться плодами. Вірус міститься в сечі і слині кажанів, і ймовірно свині заразилися, поїдаючи фрукти, забруднені слиною і сечею кажанів-вірусоносіїв. Ситуація в Малайзії мала багато спільного з вірусом Хендра, з передачею вірусу людям через ссавця-посередника. Після спалаху захворювання в Малайзії, було декілька спалахів викликаного вірусом Ніпах енцефаліту у жителів Індії і Бангладеш, причому очевидно передача вірусів від кажанів людині відбувалася безпосередньо, без участі свиней. Найімовірніше, у Бангладеш і Індії люди заражались при споживання фруктів або продуктів з них (наприклад, свіжого соку фінікової пальми), забруднених сечею або слиною інфікованих кажанів. Також були отримані докази прямої передачі вірусу від людини людині.

7.7.2. Віруси в нових регіонах

Вірус Західного Нілу

У 1999 році деякі мешканці Нью Йорка захворіли очевидним вірусним енцефалітом; надалі низка хворих померла. В цей же час захворіли деякі птахи в зоопарку, також почала спостерігатися загибель диких птахів, особливо ворон. Діагностичні тести показали, що хворі люди і птахи були інфіковані вірусом Західного Нілу.

Цей вірус відомий з 1937 року, коли уперше був виділений у жінки в регіону Західного Нілу в Уганді. Окрім Африки, цей вірус зустрічався в Східній Європі, Західній Азії і Середньому Сході, але ніколи до 1999 року не траплявся в Північній Америці. У більшості випадків зараження людей вірусом Західного Нілу протікає безсимптомно, але близько 20% інфікованих захворює. Симптомами захворювання є лихоманка і біль в м'язах. Менш ніж у одного відсотка інфікованих людей захворювання поширюється до центральної нервової системи, викликаючи важке захворювання типу енцефаліту, при якому людина може померти. Як правило, це трапляється у людей старше 60 років. Захворювання, що викликається вірусом, відоме як енцефаліт Західного Нілу або лихоманка Західного Нілу.

Вірус Західного Нілу належить до родини *Flaviviridae*. Вірус має широке коло хазяїв і вражає птахів, людей і інших хребетних тварин. Також він реплікується в комарах, які і є переносниками вірусу між різними хребетними тваринами. Захист від цього вірусу включає використання репелентів, що відлякують комах, і обробку ділянок розмноження комарів

інсектицидами.

Залишається невідомим, яким чином вірус потрапив до США в 1999 році; проте нині він широко поширився, за п'ять років досягнувши Канади, Центральної Америки і Карибських островів. Цей вірус викликає сотні смертей людей в Північній Америці. Напевно вірус поширюється птахами, оскільки специфічні до нього антитіла були виявлені у сорок і чорних дроздів, хоча птахи були здоровими.

Вірус «синього язика»

Вірус «синього язика», або блутангу, або катаральної лихоманки овець, належить до родини реовірусів, роду *Orbivirus*. Він викликає захворювання жуйних тварин, включаючи овець, кіз і корів. Переносниками вірусу служать комахи.

Усі жуйні тварини сприйнятливі до вірусу, проте зараження призводить до важкого захворювання тільки у деяких хазяїв, головним чином у деяких порід овець і деяких видів оленів. У хворих тварин язик може стати опухлим і набути синього кольору. Заражені і не хворі інфіковані тварини є резервуаром інфекції. Вірус переноситься деякими видами ку-суючої мошки роду *Culicoides*, таким чином зона поширення вірусу обмежена територіями, де зустрічаються ці мошки. Крім того, передача вірусу обмежена часом, коли мошки є активними.

Блутанг впродовж тривалого часу відомий в Африці і на Середньому Сході. У Європі цей вірус зустрічався тільки зрідка, проте з 1998 року вірус почав поширюватися на північ. В 2004 році він проявився на 800 км північніше, ніж коли-небудь раніше, і захворювання вбило більше мільйона овець. Виявилось, що мошки, які служать переносником вірусу, почали поширюватися на північ, в Європу, ймовірно внаслідок потепління клімату.

7.7.3. Віруси в нових видах хазяїв в нових регіонах

Віруси Марбург і Ебола

У 1967 році в місті Марбург в Німеччині 31 працівник лабораторії захворів геморагічною лихоманкою. Ці люди контактували з кров'ю, органами і культурою клітин зелених мавп, яких упіймали в Уганді в Африці. Семеро хворих померли, і було п'ять випадків захворювання серед персоналу лікарні, який мав контакт з кров'ю хворих. Дослідження виявили, що мавпи були заражені вірусом, який передався співробітникам лабораторії і від них працівникам лікарні.

Вірус виявився такого типу, який раніше не зустрічався, з подовженими віріонами, деякі з яких були прямими, а деякі зігнутими. Цей вірус був названий вірусом Марбург, і віднесений до родини філовірусів (*Filoviridae*), від латинського слова *filum*, що означає нитку.

У 1976 році стався спалах подібного захворювання в Африці біля річки Ебола в Заїрі і Судані. У хворих був виділений вірус, подібний до вірусу Марбург, і цей новий вірус назвали вірусом Ебола. Після 1976 року були ще ряд спалахів захворювання, викликаного вірусом Ебола, в різних районах центральної Африки. Захворювання, що викликаються вірусами, дістали назву геморагічна лихоманка Марбург і геморагічна лихоманка Ебола. Вірус Ебола виявився більш небезпечним, у випадку зараження смертність варіює від 50 до 90%.

Остання епідемія лихоманки Ебола сталася протягом 2014–2015 років у деяких країнах Африки, зокрема Гвінеї, Ліберії, Сьєрра-Леоне, Нігерії, Сенегалі. Летальність складала біля 60–70%; загалом від хвороби померло біля 20000 осіб.

Яким чином ініціюються спалахи захворювання, залишається загадковим. Низка даних

вказує на те, що в деяких випадках люди заражалися при контакті з кров'ю заражених не-людиноподібних приматів. Після первинного спалаху в Німеччині стало відомо, що африканські зелені мавпи можуть бути інфіковані вірусом Марбург. Також було встановлено, що горили, шимпанзе і антилопи-дукери можуть бути заражені вірусом Ебола, і цей вірус може нести відповідальність за значну смертність у цих видів.

Віруси Ебола і Марбург є присутніми в крові заражених хазяїв, і можуть заразити людину при контакті з тілом зараженої тварини, яка могла бути убитою в результаті полювання. Передача вірусу від людини до людини може відбуватися при контакті з кров'ю заражених індивідів.

Вважається вірогідним, що декілька інших видів тварин є резервуарами вірусів Марбург і Ебола, і зараження у цих видів певно не призводить до серйозного захворювання. Незважаючи на численні експедиції, на сьогодні немає чітких даних стосовно круга хазяїв цих вірусів і видів, які є їх резервуарами.

Вірус віспи мавп

Віспа мавп є захворюванням, подібним до віспи у людей. Віруси, що викликають віспу мавп, належать до родини поксвірусів (*Poxviridae*). З 1970 року в Африці відбуваються випадки зараження людини вірусом віспи мавп; деякі з таких випадків виявилися фатальними.

У 2003 році деякі жителі США захворіли загадковою хворобою, симптоми якої включали висип і лихоманку. Виявилось, що ці люди заражені вірусом віспи мавп, який потрапив в США з дрібними ссавцями, імпортованими з Гани. Вірус заразив лугових собак, яких тримали як домашніх вихованців, а потім перейшов на людей.

7.7.4. Нові віруси

Коронавіруси

Вірус атипової пневмонії

У 2002 році нове респіраторне захворювання людини виникло в південному Китаї. Наступного року один з лікарів, який лікував хворих, поїхав в подорож до Гонконгу, де захворів і помер. Згодом люди, які зупинялися в тому ж готелі, що і лікар, що помер, поїхали в Сінгапур, В'єтнам, Канаду і США, і вони прихопили з собою інфекційного агента. Таким чином почалася епідемія захворювання, яке отримало назву важкого гострого респіраторного синдрому (ВГРС), або атиповій пневмонії. Слід зазначити, що влада Китаю спочатку приховувала факт появи нового захворювання, що сприяло його поширенню.

Ознаки і симптоми атипової пневмонії нагадували грип і включали жар, біль в м'язах і горлі, кашель і задишку. Близько 90% видужували, але для інших 10% це захворювання виявилось летальним. Це були в основному люди, які мали додаткові захворювання, типу діабету, хвороб серця або послаблений імунітет. На перший погляд атипова пневмонія належить до хвороб дихальних шляхів, але у багатьох хворих інфекція поширювалася також на інші частини тіла. У деяких пацієнтів розвивалася діарея, і через декілька тижнів вірус знаходили в калі і сечі.

Причиною захворювання виявився новий коронавірус. У природі не знайдено видів, що є резервуаром для вірусу атипової пневмонії. Коронавіруси з близькими вірусу атипової пневмонії геномами були виділені у продавців тварин в регіоні Китаю, де атипова пневмонія уперше з'явилася. Антитіла до цих вірусів були знайдені у працівників магазинів, але ніхто з них не хворів на атипову пневмонію. Схожий вірус також був виділений з декількох видів кажанів. Є вірогідним, що коронавіруси людини і інших видів ссавців неодноразово схрещувалися в організмі людей, але більшість вірусів, що з'явилися таким шляхом, були

нездатні ефективно передаватися від людини людині. Швидше за все, коронавірус атипової пневмонії виявився результатом подібного схрещування рідкісних вірусів, який придбав здатність передачі від однієї людини до іншої. Спалах атипової пневмонії контролювався з використанням карантинних заходів, проте було зафіксовано 8437 випадків захворювання, серед хворих біля 800 людей померло.

Коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому

Перші випадки захворювання, яке спричинив новий вірус, були зареєстровані у людей на початку осені 2012 року у Саудівській Аравії. Захворювання з переважним ураженням органів дихання спричиняв новий вид вірусу з роду *Betacoronavirus*, підродини *Coronavirinae*, який в 2013 році отримав офіційну назву «коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому» (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV). До літа 2015 випадки MERS-CoV були виявлені в 23 країнах світу, включаючи, зокрема, Саудівську Аравію, Велику Британію, Катар, Ємен, Об'єднані Арабські Емірати, Францію, Німеччину, Італію, Грецію, Туніс, Єгипет, Малайзію, Південну Корею. Станом на 27 січня 2016 року згідно сповіщень ВООЗ в світі зареєстровано 1 638 підтверджених випадків захворювання, яке спричинює збудник БКРС, зокрема зафіксовано 587 смертей.

7.7.4.2. Нові штами вірусу грипу

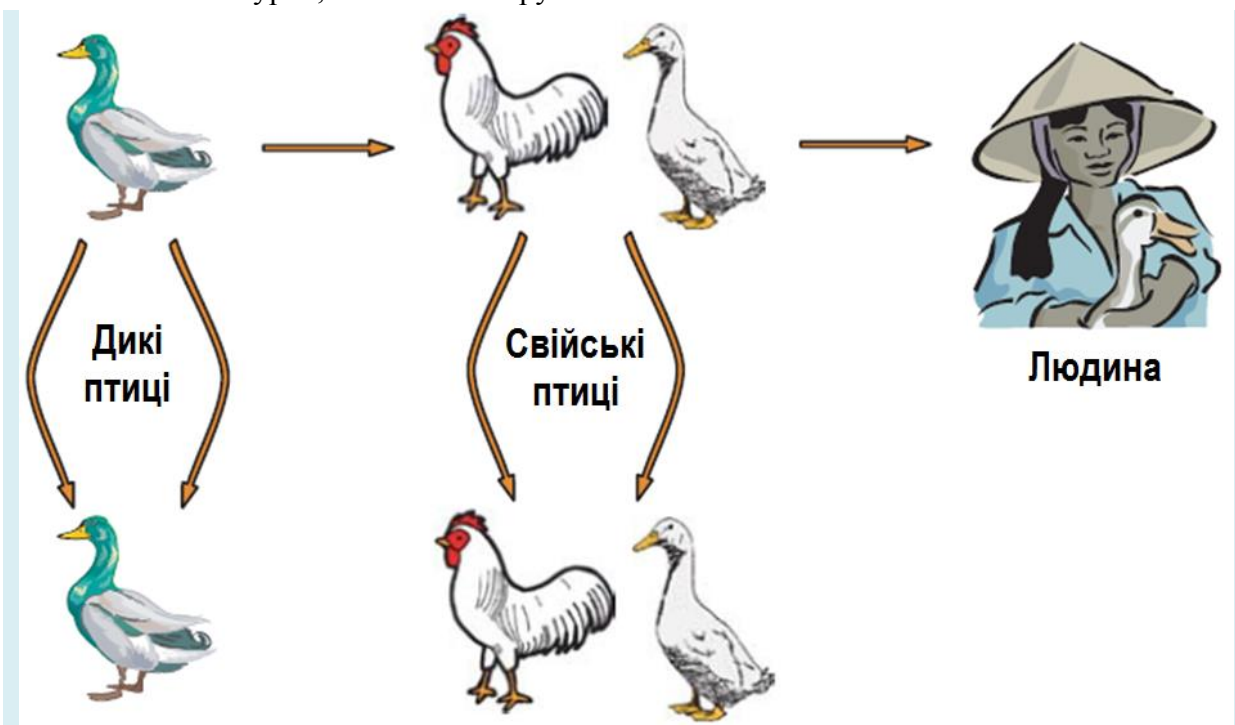
Родина ортоміксовірусів (*Orthomyxoviridae*) включає віруси грипу А. Віріони мають на поверхні два типи глікопротеїнів: гемаглютинін (Н) і нейрамінідазу (N). Є 16 типів антигена Н і 9 типів антигена N; у кожному типі є багато підтипів. Час від часу з'являються нові комбінації Н і N, сформовані пересортовуванням генів, які викликають пандемії. Хазяями вірусу грипу А є головним чином птахи, які звичайні для водних місць життя, наприклад качки, гуси і чайки. Ці птахи придбавають вірус при ковтанні або вдиханні, і вірус заражає їх кишкові і/або дихальні шляхи. Зараження більшістю штамів вірусів не призводить до захворювання, але деякі штами високо патогенні і можуть вбивати своїх літаючих хазяїв. Віруси можуть поширюватися в нові місця при міграції птахів.

Деякі штами вірусу грипу А заражають види ссавців, включаючи свиней, коней і людей. Основним місцем реплікації вірусу є дихальні шляхи. Зазвичай люди заражаються тільки вірусами які мають Н типу 1, 2 або 3 і N типу 1 або 2. Перебіг хвороби зазвичай досить важкий, і деякі хворі помирають, або внаслідок безпосередньої дії вірусної інфекції, або при дії вторинних патогенів, які здатні інфікувати пошкоджений вірусами епітелій дихальних шляхів. Така ситуація спостерігається зазвичай. Проте іноді деякі штами грипу А, що заразили перелітних птахів, можуть виявитися високо патогенними для птахів, здатні переходити на свійських птиць і перейти на людей (мал. 7.20).

Така ситуація сталася в Гонконзі в 1997 році, коли вірус типу H5N1 викликав спалах захворювання свійської птиці. Вірусом також заразилися вісімнадцятеро людей, і шість з них померло. Щоб покласти край спалаху захворювання, уся свійська птиця в Гонконзі була забита. Вірус H5N1 з'являвся в азіатських країнах в 2003 році, в Європі в 2005 році і в Африці в 2006 році. Мільйони качок, курей і індичок померли від захворювання або були забиті; вірус H5N1 може також заразити людину, викликаючи важке респіраторне захворювання, що у багатьох випадках призводить до смерті.

Приблизно в цей же час в Азії з'явився вірус H9N2, який викликав захворювання свійської птиці з деяким числом випадків переходу на людину. Були виявлені також інші варіанти вірусу «пташиного грипу», наприклад H7N3. Спалахи пташиного грипу серед диких або свійських птиць періодично виявляють у різних країнах. Більшість випадків захворювання

людей "пташиним грипом", викликаних вірусами H5N1 і H9N2, а можливо і усі такі випадки, відбувалися з людьми, які працювали зі свійською птицею і які ймовірно заразилися вірусом або при прямому контакті з самими птахами, або з послідом птахів. Як і багато інших вірусів тварин, ці віруси пташиного грипу очевидно не мають вираженої здатності передаватися від людини людині. Вірус H5N1 заражає також інших ссавців, включаючи кішок; у зоопарку Таїланду тигри і леопарди померли від грипу в результаті зараження при живленні м'ясом курей, які містили вірус.



Мал. 7.20. Шляхи передачі вірусу "пташиного грипу" H5N1 і H9N2.

На грип хворіють також свині. Практично у всьому світі спалахи хвороби виникають серед свиней круглий рік, а в зонах з помірним кліматом – найчастіше восени і зимою. У багатьох країнах проводиться регулярна вакцинація популяцій свиней від свинячого грипу. Найчастіше віруси свинячого грипу належать до підтипу H1N1, але серед свиней циркулюють і інші підтипи (такі як H1N2, H3N1 і H3N2).

Навесні 2009 року в Мексиці стався спалах грипу, який влада спочатку оголосила "піз-носезонним грипом". Захворювання виявилось незвичайно заразним, і призвело до смерті 81 людини. Потім захворювання поширилося на США. Аналіз вірусу грипу, що викликав захворювання, показав його подібність з вірусів свинячого грипу. Так і почалася "пандемія свинячого грипу", з якою досі не можуть розібратися, чи була це пандемія, або необґрунтована паніка, або грандіозне обдурювання.

Спалах нового штаму вірусу грипу серед людей в 2009 році, який став відомим як «свинячий грип», був викликаний вірусом підтипу H1N1, який володіє найбільшою генетичною подібністю до вірусу свинячого грипу. Походження цього штаму точно не відоме. Проте Всесвітня організація по охороні здоров'я тварин (World Organization for Animal Health) повідомляє, що епідемічне поширення вірусу цього ж штаму не вдалося встановити серед свиней. Інакше кажучи, у свиней не було епідемії того вірусу, на який хворіли люди! Свині можуть бути інфіковані вірусом грипу людини, і саме це могло статися під час спалаху «свинячого грипу», коли з деяких тварин були виділені відповідні віруси.

7.7.5. Віруси, які з'являються знову

Члени родини *Paramyxoviridae*, віруси кору і свинки, є важливими патогенами людини. Особливо важливою хворобою є кір, яка є істотною причиною смертності в країнах, що розвиваються. Згідно з статистикою ВООЗ, в 1980 році, до впровадження широкої вакцинації в глобальному масштабі, від кору померли 2 млн. 600 тис. чоловік. Після початку вакцинації, глобальна смертність від кору знизилася до 733000 випадків смерті в 2000 р. і до 164000 випадків в 2008 році. Утім, в 2008 р. від кору помирало майже 450 осіб в день, або 18 людей в годину.

Наприкінці 20-го сторіччя в розвинених країнах число випадків захворювань кором знизилося до одиничних без смертельних випадків, завдяки вакцинації. Проте через розповсюдження побоювань відносно безпеки вакцинації, вакцинують все менше дітей. Завдяки цьому чисельність хворих почала зростати. Таким чином, віруси кору (і свинки) є вірусами, які можна назвати такими, що з'являються знову.

Додаткове читання до глави 7.

1. Архипова Е. И., Исаков В. А. Социальная значимость распространения герпеса и ВИЧ-инфекции. Современные подходы к профилактике и лечению // Матер. научной сессии ННЦ СЗО РАМН (сб. научн. трудов). В. Новгород: Медицина, 2003. – Т.2. – С. 66–76.
2. Кускова Т.К., Белова Е.Г. Семейство герпес-вирусов на современном этапе // <http://www.lvrach.ru/2004/05/4531295/?format=print>
3. Липатов А.С., Смирнов Ю.А., Каверин Н.В., Вебстер Р.Г. Эволюция вирусов гриппа птиц H5N1 с 1997 по 2004 г. в Южной и Юго-Восточной Азии // Вопросы вирусологии. – 2005. – Т.50, №4. – С. 11–17.
4. Пейлиз П., Кингсбери Д.У. Генетика вирусов гриппа. М.: Медицина, 1986. – 366 с.
5. Степаненко Р.Л. Генітальна папіломавірусна інфекція: сучасний стан проблеми та перспективи її розв'язання // Укр. жур. дерматолог. венеролог. косметолог. – 2009. – №2. – С.88–105.
6. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В., Наследникова И.О., Воронкова О.В., Слепичева Н.Р. Особенности иммуносупрессии при вирусных инфекциях // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 4. – С. 112–118.
7. Athanasopoulos T., Fabb S., Dickson G. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus: characteristics and applications to acquired and inherited diseases (review) // Int. J. Mol. Med. – 2000. – V6, №4. – P.363–375.
8. Clark B., McKendrick M. A review of viral gastroenteritis // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2004. – V.17, №5. – P.461–469.
9. Efstathiou S., Preston C.M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency // Virus Res. – 2005. – V.111, №2. – P.108–119.
10. Fauci A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease // Nature. – 1996. – V.384, №6609. – P. 529–534.
11. Howard R.S. Poliomyelitis and the postpolio syndrome // BMJ. – 2005. – V330, №7503. – P. 1314–1318.
12. Mogensen T.H., Melchjorsen J., Larsen C.S., Paludan S.R. Innate immune recognition and activation during HIV infection // Retrovirology. – 2010. – doi: 10.1186/1742-4690-7-54.
13. Satija N., Lal S.K. The molecular biology of SARS coronavirus // Ann. N.-Y. Acad. Sci. – 2007. – V.1102. – P. 26–38.
14. Sinclair J., Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus // J. Gen. Virol. – 2006. – V.87(Pt 7). – P.1763–1779.

Глава 8. Вірусний канцерогенез

Ракові пухлини людини і тварин є злоякісними новоутвореннями, які з'являються у результаті безперервної проліферації клону клітин, що має походження від нормальних клітин тіла. Клітини зазнають змін, відомих як трансформація, в результаті подій, які включають мутації, активацію онкогенів і інактивацію супресорів пухлини. Деякі типи пухлин і типи клітин, з яких ці пухлини утворюються, показані на слайді.

Для більшості пухлин повна послідовність подій, які перетворюють нормальну клітину в клітину пухлини, залишається не до кінця відомою; як вважають, потрібні від чотирьох до шести кроків. Деякі з цих кроків в трансформації клітини можуть бути запущені чинниками середовища, які включають деякі хімічні речовини, деякі форми опромінення і деякі віруси.

Віруси, здатні викликати пухлини, називають онкогенними вірусами. Доказом того, що вірус онкогенний, служить зокрема постійна присутність в клітинах пухлини ДНК вірусу, яка може бути частиною вірусного генома або представляти увесь геном. У деяких типах пухлин ДНК вірусу інтегрована в хромосому клітини, в інших випадках є присутніми множинні ковалентно замкнені копії кільцевої ДНК. У багатьох випадках в клітинах пухлини спостерігається експресія одного або декількох генів вірусу, і можна виявити вірусні білки. Для декотрих типів пухлин показана участь вірусу у більшості випадків виникнення пухлини, але не в усіх. Є пухлини, у яких ДНК і/або білки вірусу виявляються в меншості випадків пухлини. У подібних випадках можливо, що вірус є тільки одним з низки канцерогенних чинників, які викликають утворення цього типу пухлин.

8.1. Приклади пухлин, виникнення яких пов'язано з вірусами

8.1.1. Пухлини, пов'язані з вірусами папіломи

Цервікальна карцинома, або рак шийки матки, є третьою з найбільш поширених форм раку у жінок; щорічно у світі трапляються приблизно півмільйона нових випадків виникнення пухлини і близько 280000 смертей. Більшість, а може бути і усі, випадки раку шийки матки пов'язані із зараженням папіломавірусами.

У родині папіломавірусів представлені невеликі ДНК-геномні віруси, що вражають ссавців і птахів. Є більше 100 типів папіломавірусів людини, що розрізняється за послідовністю ДНК. Вони потрапляють в організм через невеликі садна і заражають клітини (кератиноцити) шкіри або слизової оболонки, що синтезують кератин. Кожен тип вірусу папіломи людини заражає переважні ділянки, такі як руки або інші місця, і зараження може привести до утворення бородавки (папіломи).

У більшості випадків зараження папіломавірусами не призводить до персистентної інфекції, проте в певній кількості випадків організм хазяїна не очищається імунною системою від вірусів. Люди, у яких залишається персистентна інфекція, мають певний ризик розвитку злоякісної пухлини. Ризик пов'язаний приблизно з 15 типами вірусів папіломи людини; зараження іншими типами папіломавірусів не пов'язане з ризиком канцерогенної трансформації.

Клітинами-хазяями вірусів папіломи є кератиноцити. Ці клітини після диференціювання в нормі припиняють ділення. Проте папіломавірус потребує активної реплікації ДНК в клітинах хазяїна, тому вірус індукує перехід кератиноцитів у фазу S клітинного циклу. Далі клітини зазнають декілька циклів клітинних ділень, які зазвичай обмежені декотрою кіль-

кістю. Проте у разі зараження типом вірусу, який відноситься до здатних викликати злоякісну пухлину, ділення можуть тривати неконтрольовано, внаслідок чого і виникає карцинома.

Стадії переходу нормальних клітин в ракові включають ряд морфологічних змін, які можна виявити на мазках кератиноцитів, зокрема шийки матки. У разі виявлення передпухлинних клітин, їх можна убити або видалити, запобігаючи розвитку пухлини. У передпухлинних клітинах завжди виявляється частина генома або увесь геном вірусу папіломи людини: ДНК вірусу інтегрується в хромосому. У цих клітинах цикл реплікації вірусу не завершується, і нові віріони не формуються.

Є також докази, що вірус папіломи людини, що відноситься до типу, здатного викликати рак, є причиною не лише раку матки, але і карцином на інших ділянках тіла, включаючи статеві органи, анус, голову і шию. У цих випадках в клітинах пухлини також міститься ДНК вірусу.

Вірус папіломи людини також бере участь у формуванні досить рідкісної форми раку шкіри, так званої бородавчастої епідермодисплазії, яка має генетичну основу. При цьому захворюванні люди у край сприйнятливості до зараження вірусом, особливо тих типів, які рідко зустрічаються в популяції людини, типів 5 і 8. Зараження відбувається в дитинстві, бородавки поширюються по усьому тілу, і в регіонах з високою сонячною радіацією у 25-33% хворих розвиваються так звана плоскоклітинна карцинома або плоскоклітинний рак. У випадку карциноми такого типу, проте, ДНК вірусу рідко інтегрується в хромосому хазяїна.

8.1.2. Пухлини, пов'язані з вірусом поліоми

Віріони поліомавірусів виявляються у ссавців і птахів, проте у більшості випадків зараження протікає безсимптомно. Введення вірусів в певні види тварин, проте, може індукувати розвиток багатьох видів пухлини. Цей факт і послужив причиною назви вірусів (poly – багато і oma – пухлина, скупчення). Є низка доказів, що поліомавіруси можуть викликати ряд злоякісних пухлин у людини.

Відомі два поліомавірусу людини: віруси JC і BK. Ці назви є ініціалами людей, з яких вони уперше були виділені. Обидва віруси дуже поширені і виявляються більш ніж у 80% дорослих людей. Ці віруси можуть індукувати пухлини у новонароджених хом'яків і трансформувати клітини в культурі. Є докази, що вони в деяких випадках пов'язані з певними типами пухлин у людей, особливо з пухлинами мозку. Доказами є присутність ДНК і білків вірусів JC і BK в клітинах пухлини.

Поліомавірус мавп SV40 був уперше виділений в 1960 році з культури клітин нирки макаки резус. Цю культуру клітин використали для продукування вірусів поліомієліту для отримання вакцини. Процедура контролю якості вакцини передбачала її ведення хом'якам, і у деяких з цих тварин розвинулися пухлини. Надалі було встановлено, що введення SV40 новонародженим хом'якам може викликати карциноми, саркоми, лімфоми і лейкомію, залежно від місця введення вірусу.

Вірус SV40 набув сумної популярності, оскільки цим вірусам була забруднена вакцина від поліомієліту. Незабаром після виявлення, SV40 був виділений з ін'єкційної форми вакцини від поліомієліту, виробленої в період від 1955 до 1961 року. Мабуть, вірус потрапив у вакцину з клітин нирок інфікованих мавп, яких використали для вироблення вакцини. Невідомо, як широко був поширений вірус SV40 у людській популяції до 1950-х років, але показано, що 12% зразків крові німецьких студентів в 1952 році містили антитіла проти SV40. Вакцини, вживані в країнах колишнього СРСР, в Китаї, Японії і Африці,

могли бути заражені SV40 до 1980 року. Таким чином, цим вірусом виявилися зараженими мільйони людей.

З часу відкриття вірусу не вщухають спори, чи може він викликати захворювання у людей. Ряд досліджень вказували на те, що цей вірус може бути причиною виникнення злоякісних пухлин. Проте інші дослідники не згодні з тим, що вірус викликає рак. У США National Cancer Institute в 2004 році заявив про те, що хоча SV40 і викликає рак в деяких модельних тваринах, «накопичений істотний об'єм епідеміологічних даних, що свідчать про те, що вірус SV40, ймовірно, не викликає рак у людей».

8.1.3. Пухлини, пов'язані з вірусом Епштейна-Барр

Лімфома Беркіта – це пухлина В-лімфоцитів, яка з високою частотою зустрічається у дітей в центральній Африці. Клітини пухлини мають персистентне зараження одним з вірусів герпесу, вірусом Епштейна-Барр. Постійним відхиленням в клітинах пухлини лімфоми Беркіта є перегрупування хромосом, в результаті якого ген *c-myc* розташовується біля енхансеру гена імуноглобуліну. Це призводить до експресії *c-myc* на ненормально високому рівні. Ген *c-myc* кодує білок, що зв'язується з ДНК і є фактором транскрипції. Постійна експресія гена призводить до порушення регуляції багатьох генів, що у тому числі відповідають за проліферацію клітин.

У деяких регіонах світу, окрім Африки, зрідка також спостерігаються випадки лімфоми Беркіта, проте вони не пов'язані з вірусом Епштейна-Барр. В той же час хромосомна перебудова, що призводить до транслокації гена *c-myc* і його неконтрольованій експресії, знайдена в усіх пухлинах, незалежно від присутності вірусу. Таким чином, вірус є одним з декількох агентів, які можуть індукувати в клітинах таку перебудову хромосом. При цьому вірус має найбільше значення серед інших можливих чинників в індукції злоякісного росту В-лімфоцитів.

Іншою пухлиною, що асоціюється з вірусом Епштейна-Барр, є носоглоткова карцинома. Ця пухлина, як і лімфома Беркіта, розподілена у світі нерівномірно і зустрічається переважно в певних регіонах.

Вірус Епштейна-Барр широко поширений і ним заражена більшість людей. Причини, через які пов'язані з ним пухлини зустрічаються у людей в основному в певних регіонах, залишаються незрозумілими

З вірусом Епштейна-Барр пов'язані також інші пухлини, а саме:

- деякі випадки лімфоми Ходжкіна;
- неходжкінські лімфоми у хворих СНІД;
- пост-трансплантаційна лімфопроліферативна хвороба.

На відміну від лімфоми Беркіта і носоглоткової карциноми, лімфома Ходжкіна не обмежена певним географічним регіоном. У разі ж неходжкінських лімфом у хворих СНІД і пост-трансплантаційної лімфопроліферативної хвороби, вони спостерігаються у людей з порушеним імунітетом, або в результаті СНІД, або в результаті застосування імуносупресорів.

Онкогенний потенціал вірусу Епштейна-Барр добре проявляється в культурі В-лімфоцитів. Якщо клітини заразити вірусом, вони синтезують цілу низку білків вірусу, які безперервно вводять клітини в клітинний цикл, що призводить до появи лімфобластних клітинних ліній. В організмі людини проліферація таких В-лімфоцитів контролюється Т-клітинами, проте у випадку послаблення Т-клітинного імунітету контроль може виявитися недостатнім, внаслідок чого і розвиваються пухлини.

8.1.4. Саркома Капоші

Саркома Капоші уперше було описана в 19-му сторіччі як рідкісна пухлина шкіри, яка розвивалася у літніх людей в середземноморському регіоні. Після появи СНІДу вона стала однією з найбільш звичайних пухлин хворих, і в цьому випадку пухлина поширюється по усьому тілу і стає агресивнішою. Вважають, що клітини пухлини мають походження від ендотеліальних клітин.

У 1994 році було виявлено, що клітини пухлини містять новий герпесвірус, названий асоційованим з саркомою Капоші герпесвірусом. Вірус виявляється у більшості частин світу, проте переважно поширений тільки в певних регіонах, таких як центральна Африка. Ризик розвитку саркоми Капоші корелює з поширеністю вірусу в популяції.

8.1.5. Лейкемія зрілих Т-лімфоцитів

Лейкемія зрілих Т-лімфоцитів пов'язана із зараженням Т-лімфотропним вірусом людини 1. Регіони світу, де цей вірус широко поширений, такі як південний захід Японії, мають і високу поширеність пухлини. Т-лімфотропний вірус людини 1 є ретровірусом, і кожна клітина пухлини має копію провірусної ДНК, інтегровану в хромосому.

8.1.6. Гепатоцелюлярна карцинома

Гепатоцелюлярна карцинома (пухлина печінки) найбільш поширена форма раку печінки. Щорічно у світі від неї вмирає близько 600000 осіб. Причиною пухлини є низка чинників, серед яких вживання мікотоксинів з їжею, і два віруси: вірус гепатиту В і вірус гепатиту С.

Найбільше значення має вірус гепатиту В; поширеність пухлини тісно корелює з поширеністю персистентної інфекції вірусу гепатиту В. Найбільш висока поширеність пухлини і вірусу спостерігається в Азії і центральній і південній Африці. У більшості пухлин ДНК вірусу гепатиту В інтегрована в геном клітини, і у більшості випадків вірусна ДНК зазнає перебудови, до складу яких входять делеції.

Інший вірус, пов'язаний з раком печінки, вірус гепатиту С, є флавівірусом. Це єдиний вірус класу V по класифікації Балтімора, тобто вірус, що містить одноланцюгову (+)РНК, для якого показана онкогенність.

Обидва віруси при зараженні викликають імунну відповідь. У деяких людей імунна реакція успішно пригнічує інфекцію, проте у багатьох випадках інфекція стає персистентною і зберігається усе життя. У деяких людей, заражених вірусом гепатиту В або вірусом гепатиту С, розвивається цироз печінки, і зрештою часто розвивається рак.

Віруси викликають рак не лише у людини. У різних видів тварин злоякісні пухлини також часто асоційовані з вірусами. Спалахи деяких подібних захворювань представляють серйозну проблему для тваринництва.

8.2. Як віруси викликають рак

Більшість індукованих вірусами пухлин розвиваються після тривалого періоду персистентної інфекції онкогенного вірусу; наприклад для лейкемії зрілих Т-клітин цей період складає близько 60 років. Вірусна інфекція зберігається в хазяїнові, незважаючи на імунну відповідь, наприклад утворення специфічних для вірусів антитіл. В деяких випадках персистентна інфекція є латентною впродовж тривалого часу, коли експресується незначна кількість генів вірусів, як наприклад це відбувається для вірусу Епштейна-Барр. У інших випа-

дках, наприклад для вірусів гепатиту В і гепатиту С, персистентна інфекція є продуктивною.

Хоча дуже багато людей мають персистентну інфекцію вірусів, які є потенційно онкогенними, тільки у відносно невеликої частки розвиваються пов'язані з вірусами пухлини. Близько 90% людей заражені вірусом Епштейна-Барр, але тільки у невеликої кількості розвиваються пов'язані з цим вірусом пухлини. У жінок, що мають персистентну інфекцію вірусу папіломи людини, що відноситься до типу з високим ризиком розвитку пухлини, рак шийки матки розвивається приблизно у трьох відсотків. Приблизно такі ж цифри є для людей, які мають персистентне зараження вірусами гепатиту В або гепатиту С, або Т-лімфотропним вірусом людини 1.

Оскільки злоякісні пухлини розвиваються тільки у невеликої частки людей, заражених вірусами, очевидно, що сама по собі вірусна інфекція не викликає рак. У цьому беруть участь і інші причини, зокрема дія певних чинників довкілля, генетичні особливості і імунodefіцит.

Імунодефіцит різко посилює ризик розвитку багатьох пов'язаних з вірусами пухлин, і природа імунodefіциту впливає на тип пухлин, які можуть розвиватися. У хворих на СНІД сильніше зростає ризик розвитку саркоми Капоші, ніж у хворих після трансплантації органів, яким дають імунодепресанти. При цьому імунodefіцит не збільшує ризику усіх видів раку, пов'язаних з вірусами. Наприклад, хворі на СНІД не мають збільшеного ризику розвитку раку печінки.

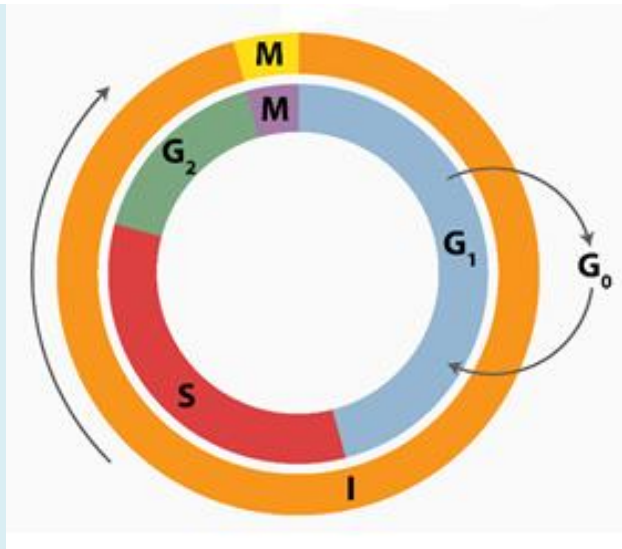
Таким чином, ризик розвитку злоякісної пухлини у хазяїна, зараженого онкогенними вірусами, залежить від складної взаємодії між станом хазяїна, чинниками довкілля, які впливають на хазяїна, і змінами в клітинах, які викликаються при зараженні вірусом.

8.2.1. Тонке втручання в контроль клітинного циклу

Для завершення свого циклу реплікації, вірусам необхідно маніпулювати внутрішнім середовищем клітини-хазяїна, яке повинне забезпечити усі потреби вірусу. Деяким вірусам необхідно, щоб клітина була в певній фазі клітинного циклу. Багато клітин тіла тварини, включаючи людей, діляться повільно або взагалі не діляться; у останньому випадку вони затримуються на фазі G1 клітинного циклу, або як говорять, знаходяться в стані G0 (мал. 8.1).

Контроль клітинного циклу обумовлений багатьма білками; у людини два білки грають ключову роль у цьому контролі. Це білок p53 і білок ретинобластоми (pRb). Останній білок так названий тому, що його відсутність у деяких індивідуумів, обумовлена мутацією в обох копіях гена, призводить до розвитку ретинобластоми (злоякісній пухлині сітківки).

Білок p53 – це фактор транскрипції, який регулює клітинний цикл. Він виконує функцію супресора утворення злоякісних пухлин. Його часто образно називають «охоронець генома». За відсутності ушкоджень генетичного апарату білок p53 знаходиться в неактивному стані, а при появі ушкоджень ДНК активується. Результатом активації p53 є зупинка клітинного циклу і реплікації ДНК; при сильному стресовому сигналі – запуск апоптозу. Білок ретинобластоми pRb контролює експресію генів через взаємодію з факторами транскрипції.

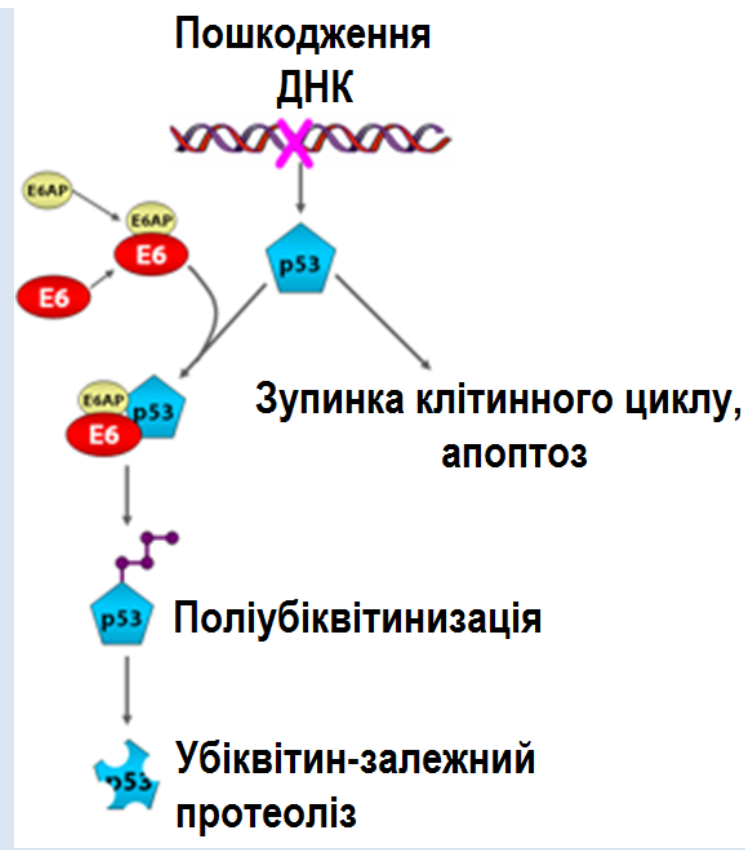


Мал. 8.1. Клітинний цикл. I – інтерфаза – період, коли клітина не ділиться. Поділяється на три фази: G₁ (англ. first gap) – пресинтетичний період, клітина росте, накопичує поживні речовини, виконує свої основні функції; S – синтетичний період, відбувається реплікація ДНК, продовжується ріст клітини; G₂ (англ. second gap) – постсинтетичний період, клітина готується до поділу. M – мітоз, поділ ядра, після якого відбувається цитокінез.

Було показано, що декілька білків онкогенних вірусів можуть взаємодіяти з p53, pRb і іншими білками, які контролюють ріст і ділення клітин. Така взаємодія підвищує вірогідність того, що клітина почне цикли ділення, що повторюються.

До вірусних білків, які втручаються в контроль клітинного циклу, належать зокрема ранні білки E6 і E7 вірусу папіломи людини. Віруси папіломи мають невеликі геноми і для реплікації їм потрібний апарат синтезу ДНК клітини-хазяїна, який доступний у фазі синтезу (S) клітинного циклу. Переходу клітин в цю фазу і сприяють білки E6 і E7.

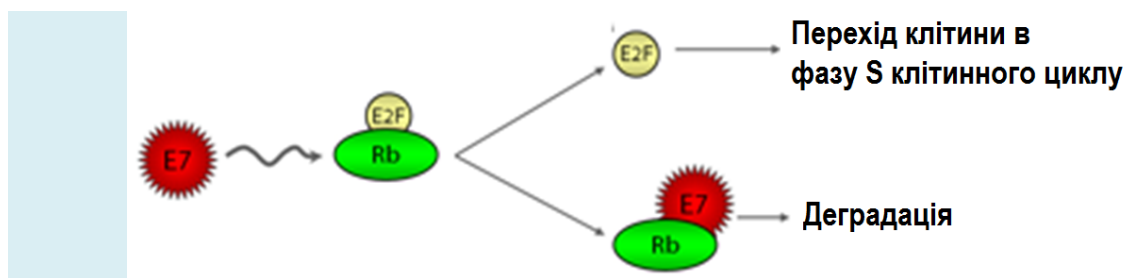
E6 зв'язується з p53, сприяючи деградації цього білку (мал. 8.2).



Мал. 8.2. Ранній білок вірусу папіломи E6 «знешкоджує» протипухлинний білок клітини p53. E6AP – асоційований з E6 білок, що кодується вірусом.

Білок E7 зв'язується з комплексом білків pRb-E2F, що призводить до дисоціації цього комплексу. E2F є фактором транскрипції клітини, який активує синтез ДНК. Підсумком усіх цих взаємодій є перехід клітини у фазу S (мал. 8.3).

Важливою особливістю типів вірусів папіломи людини, зараження якими призводить до високого ризику розвитку пухлин, є інтеграція усіх частин вірусного генома в хромосому клітини. У пухлинах геном вірусу часто виявляється неповним, але гени E6 і E7 є присутніми постійно. Безперервна експресія цих генів підтримує стан трансформації клітин і їх безперервне ділення.



Мал. 8.3. Ранній білок вірусу папіломи E7 індукує перехід клітини у фазу S клітинного циклу.

Білки клітини p53 і білок ретинобластоми грають ключову роль в контролі клітинного циклу, тому не дивно, що з ними взаємодіють не лише білки E6 і E7 вірусу папіломи людини, але і білки інших вірусів, зокрема:

- Великий антиген Т вірусу SV40 (зв'язується з p53 і pRb)
- Пов'язаний з латентністю ядерний антиген вірусу, що асоціюється з саркомою Капоші (зв'язується з p53 і pRb)
- Білок Так Т-лімфотропного вірусу людини 1 (зв'язується з p53)
- Білок Х вірусу гепатиту В (зв'язується з p53).

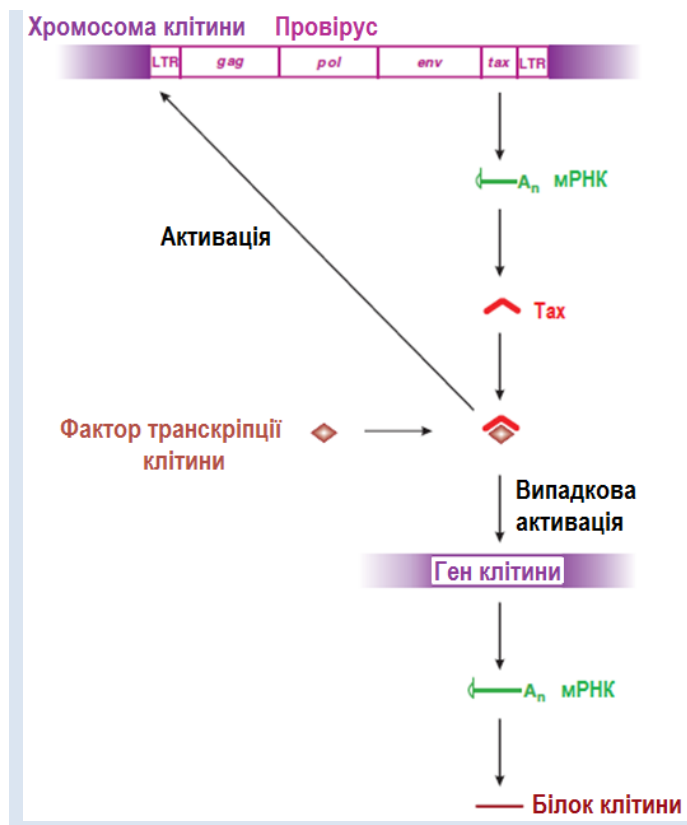
8.8.2. Випадкова активація генів клітини

Деякі віруси здатні зв'язуватися з білками клітини, які фактично не є мішенями для білків вірусу. Таке зв'язування може запустити події, які для вірусу не мають ніякої вартості, але можуть бути небезпечними для хазяїна. Білки вірусу можуть, так би мовити, ненавмисно перевести клітину в злоякісний стан за допомогою активації раніше вимкнених генів клітини, або за допомогою посилення експресії генів, які в нормі експресуються на низькому рівні.

Прикладом такого білку є білок Tax Т-лімфотропного вірусу людини 1. Цей вірус є складним ретровірусом, і ген *tax* є одним з його допоміжних генів. Ген експресується на інтегрованому в хромосому провірусі, і білок Tax, зв'язуючись з факторами транскрипції клітини, функціонує як фактор транскрипції для вірусу (мал. 8.4). Проте білок Tax впливає на експресію багатьох генів клітини, які включають регулятори клітинного циклу.

Деякі ретровіруси індукують формування пухлин внаслідок інтеграції їх провірусу в хромосому клітини в такій ділянці, в якій гени клітини-хазяїна виявляються під контролем вірусних промоторів. Це може привести до активації генів, які були вимкнені, або призвести до посилення експресії генів, які вже були активні. Деякі гени клітини, які можуть активуватися таким чином, називають протоонкогенами, оскільки їх активація може призвести до розвитку пухлини. Білки, кодовані протоонкогенами, зазвичай залучені в регуляцію генів або контроль клітинного циклу. Прикладом протоонкогена є *c-myc*. Зараження курей вірусом лейкозу птахів може привести до розвитку пухлини, коли провірус вбудовується в хромосому поряд з *c-myc*. Це призводить до значного підвищення експресії цього гена.

Слід мати на увазі, що активація ретровірусами протоонкогенів може привести до розвитку лейкемії у деяких пацієнтів, у яких ретровірусні вектори використали для генної терапії.



Мал. 8.4. Онкогенез за участю білку Tax Т-лімфотропного вірусу людини 1. Білок активує транскрипцію провірусу, але може також випадково активувати експресію генів клітини.

8.8.3. Ретровірусні онкогени

Деякі ретровіруси можуть викликати утворення ракових пухлин, оскільки в їх геномі присутні онкогени; наприклад, вірус саркоми Раусу, що викликає злоякісні пухлини у курей, містить ген *v-src*. Онкогени ретровірусів мають походження від клітинних протоонкогенів і мають з ними близьку спорідненість. У випадку саркоми Раусу онкоген вірусу *v-src* є близьким родичем протоонкогена *c-src*.

Коли протоонкоген мутує або його нормальна експресія порушується, він стає онкогеном. Ген *src*, який бере участь в розвитку багатьох пухлин, кодує протеїнкіназу. Надфосфорилювання ферментів-субстратів цієї протеїнкінази є ключовим процесом в розвитку пухлин, пов'язаних з цим геном. Ген *c-myc* кодує фактор транскрипції, і він експресується на ненормально високому рівні у випадку лімфоми Беркіта (розділ 8.1.3).

Майже усі ретровіруси, що несуть онкогени, є дефектними в результаті делецій генома. Ці віруси можуть реплікуватися тільки за допомогою ендогенних ретровірусів, або в клітинах, одночасно заражених вірусом-помічником. Наприклад, віруси саркоми мишей є дефектними, і вірусом-помічником може виступати вірус лейкемії мишей. Вірус саркоми Раусу є одним з небагатьох не дефектних ретровірусів, що містять онкоген. У вірусних онкогенів відсутні послідовності, які контролюють експресію клітинних протоонкогенів, тому якщо онкоген ретровірусу експресується в зараженій клітині, його продукт накопичується у більш високих концентраціях, ніж продукт клітинного протоонкогена.

Ретровіруси, що містять онкогени, здатні швидко індукувати розвиток пухлини, зазвичай впродовж 1–6 тижнів після зараження, що контрастує з розвитком пухлин, які індукуються іншими онкогенними вірусами. У останньому випадку пухлина може розвинутиися через роки або навіть десятиліття після встановлення персистентної вірусної інфекції.

8.3. Запобігання розвитку індукованих вірусами ракових пухлин

Логічні підходи до запобігання індукованому вірусами раку включають спроби запобігти передачі вірусів від інфікованих людей неінфікованим, тому знання шляхів передачі вірусів є важливим. Таке знання дозволяє розробити стратегії, спрямовані на зниження ризику передачі вірусу. Наприклад, більшість онкогенних вірусів людини передаються через кров або статевим шляхом, тому застосування методів, розроблених для запобігання поширенню ВІЛ, також знижує ризик зараження онкогенними вірусами.

Іншим підходом до зниження частоти передачі вірусів є вакцинація. Передача вірусу гепатиту В у більшості випадків відбувається від матері до дитини під час пологів, тому в деяких країнах з високою поширеністю вірусу гепатиту В розпочаті програми по вакцинації дітей вакциною проти цього вірусу впродовж перших двох днів після народження. Реалізація такої програми на Тайвані вже понизила частоту раку печінки у дітей, і з часом очікується зниження поширеності цього захворювання і у дорослих. Є і інші програми вакцинації як людей, так і домашніх тварин.

Альтернативним підходом в запобіганні розвитку індукованих вірусом пухлин є спроби видалення з тіла персистентної інфекції онкогенних вірусів. Проте, за рідкісним винятком часткового контролю вірусу, ці спроби доки не привели до успіху.

Додаткове читання до глави 8.

1. Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л. На пути к пониманию природы рака. Обзор // Биохимия.—2008.— Т.73, № 5.— С. 605–618.
2. Уразова Л.Н., Видяева И.Г. Рак шейки матки и вирусы папилломы: этиопатогенетические аспекты (обзор литературы) // Сибирский онкологический журнал. —

2009.– Т.31, №1.– С. 64–72.

3. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биол. Химии.–2007.– Т.47,№1. С. 3–52.
4. Blair D.G., Athanasiou M. Ets and retroviruses – transduction and activation of members of the Ets oncogene family in viral oncogenesis // Oncogene.–2000.– V.19,№55. P.6472–6481.
5. Butel J.S. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease // Carcinogenesis.– 2000.–V.21,№3.P.405–426.
6. Javier R.T., Butel J.S. The history of tumor virology // Cancer Res. –2008.–V.68, №19. –P. 7693–7706.
7. Mesri E.A, Cesarman E., Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus // Nat. Rev. Cancer. –2010.– V. 10, №10.–P.707–719.
8. Tsai W.L., Chung R.T. Viral hepatocarcinogenesis // Oncogene. –2010.– V. 29,№16. P. 2309–2324.
9. Weitzman M.D., Lilley C.E., Chaurushiya M.S. Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection // Annu. Rev. Microbiol. –2010.–V.64.–P.61–81.
10. Zheng Z.M. Viral oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses // Int. J. Biol. Sci.– 2010.–V.6,№7.–P.730–755.

Глава 9. Засоби боротьби з хворобами, що викликаються вірусами

9.1. Вірусні вакцини

Термін «вакцина» походить від латинського слова *vacca*, що означає корову. Вакцина містить матеріал, призначений для індукції придбаного імунітету. Метою застосування більшості вірусних вакцин є індукція тривалої імунності проти вірусу за допомогою встановлення імунологічної пам'яті. Завдяки цьому реакції імунітету швидко запускаються при попаданні вірусу в тіло. Для встановлення досить потужної імунологічної пам'яті необхідно, щоб вакцина індукувала енергійні реакції імунітету; іншими словами, для вакцин потрібний вірусний матеріал з високими імуногенними властивостями.

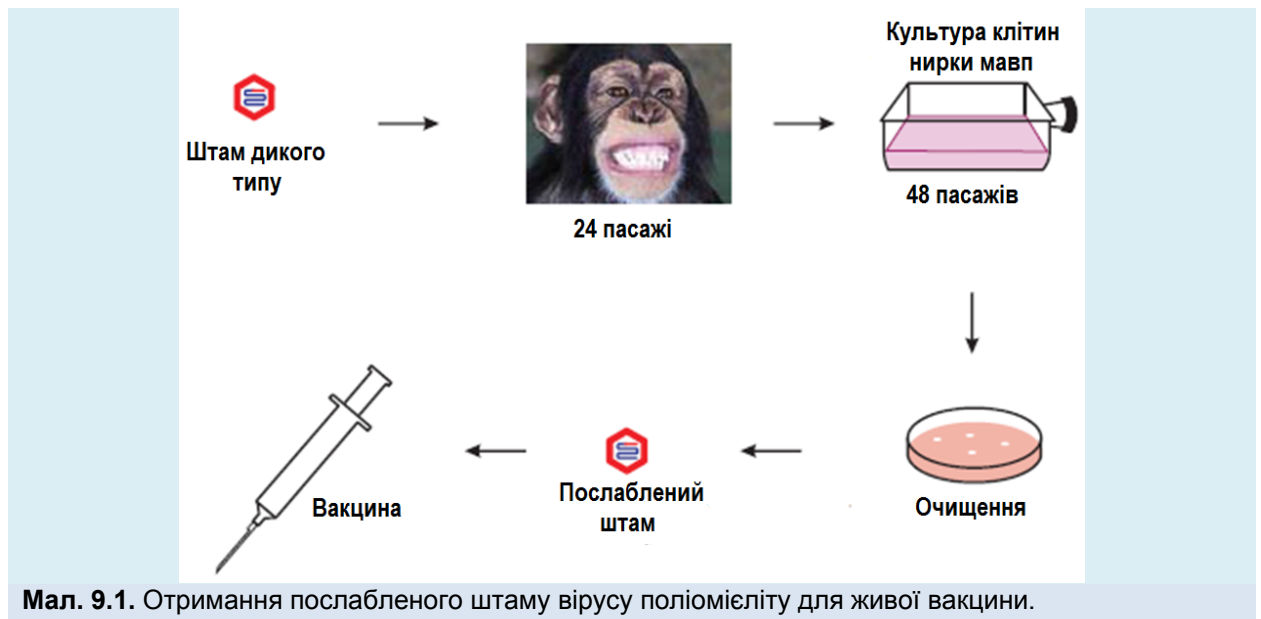
Стосовно низки вірусів, таких як віруси віспи, поліомієліту, краснухи, кору і ящура у тварин, є ефективні вакцини. Проте відносно багатьох інших вірусів, таких як ВІЛ, гепатиту С, Ебола або простого герпесу, спроби розробити вакцини доки не привели до успіху, з різних причин, найчастіше через високу мінливість антигенних варіантів вірусів.

9.1.1. Живі послаблені вірусні вакцини

Живі послаблені (атенуйовані) вакцини містять мутантні штами вірусу, які мають походження від вірулентного штаму дикого типу. Вакцини такого виду мають ряд переваг перед вакцинами інших видів. Однією з переваг є те, що в тілі накопичується збільшена кількість вірусних антигенів завдяки реплікації вірусу. Іншою перевагою є та, що імунна реакція є досить активною і в ній беруть участь В-лімфоцити, CD4 Т-лімфоцити і CD8 (цитотоксичні) Т-лімфоцити.

Жива вакцина обов'язково повинна мати дві властивості. По-перше, її антигени мають бути ідентичними антигенам штаму дикого типу або високо подібними до них, щоб імунна відповідь проти вірусу вакцини забезпечував захист і проти вірусу дикого типу. По-друге, вірус, присутній у вакцині, повинен мати дуже низьку вірулентність або не бути вірулентним взагалі.

Більшість послаблених вірусних вакцин отримують в результаті процедур типу повторних пасажів вірусу дикого типу в клітинах, не споріднених нормальному хазяїну. Вакцина штамів трьох серотипів вірусу поліомієліту, який був послаблений внаслідок втрати здатності вражати нервові клітини, була отримана шляхом пасажів штамів дикого типу в мавпах і культурі клітин нирки мавпи. Цю піонерську роботу виконав Альберт Себін (Albert Sabin) у 1953–1957 рр. (мал. 9.1).



Мал. 9.1. Отримання послабленого штаму вірусу поліомієліту для живої вакцини.

Мутації, які відповідальні за послаблення вірусу поліомієліту дикого типу, добре відомі: в геномній РНК вірусу вакцини в ділянці, що зветься домен 5, сталися заміни одного нуклеотиду на інший.

З використанням підходу, аналогічного використаному А. Себіним, отримують низку інших послаблених вакцин, зокрема вірусів свинки, кору, краснухи, жовтої лихоманки, чуми собак.

При виготовленні живих послаблених вірусних вакцин, використовують не тільки повторні пасажі вірусу дикого типу в не споріднених хазяїну клітинах. До інших підходів, які вживають з цією метою, належать такі.

- «Адаптовані до холоду» штами вірусів. Такі вакцини отримують інкубацією заражених вірусом клітинних культур при температурах, нижче оптимальних для реплікації вірусу. «Адаптовані до холоду» штами вірусів зі зниженою вірулентністю використовують для приготування вакцин вірусу грипу і респіраторно-синцитіального вірусу (викликає інфекції дихальних шляхів).

- Використання реасортантів. Для вакцини отримують реасортанти ротавірусів, у яких деякі гени належать вірусу людини, а деякі вірусу тварин.

- Використання зворотної генетики. Використання зворотної генетики дозволяє конструювати геноми вірусів для приготування вакцини, що мають понижено вірулентність, наприклад завдяки цілеспрямованому мутагенезу.

9.1.2. Інактивовані вірусні вакцини

При усіх перевагах використання живих послаблених вірусів, залишається небезпека зворотної мутації протягом реплікації вірусів, яка поверне вірусу високу вірулентність. Також є небезпека формування рекомбінантних штамів між вірусом вакцини і вірусом дикого типу. Через таку небезпеку, у багатьох країнах перейшли від використання послабленої вірусної вакцини проти поліомієліту до використання інактивованої вакцини.

Інактивовані, або убиті вірусні вакцини готують при масовому виробництві вірулентних штамів вірусу, при цьому отримані віруси позбавляють інфекційності, зазвичай обробкою хімічними препаратами типу формальдегіду. Складність методу полягає в підборі комбінації хімічних препаратів і часу реакції, які повністю інактивують вірус, але залишають його антигени досить незмінними, так що вони залишаються здатними викликати захисний імунний відгук.

Такий метод був використаний Джоном Солком (Jonas Salk) для обробки вірусу поліомієліту, що привело до розробки вакцини, що носить ім'я Солка, яка була офіційно впроваджена в 1955 році. Обробка вірусу поліомієліту включає суспендування вірусу в розчині формаліну при 37° З впродовж 10 діб. Іншими прикладами убитих вакцин є інактивовані віріони вірусу грипу, гепатиту А і ящура.

Оскільки для виробництва інактивованих вакцин використовуються вірулентні штами вірусу, у край важливо мати гарантію інактивації вірусу на 100%. Необхідність такої гарантії стала найбільш очевидною після випадку в США в 1955 році, коли чотири мільйони доз недостатньо інактивованої вакцини Солка були використані для вакцинації дітей. Серед вакцинованих виявилися 204 випадки паралітичної форми поліомієліту і 11 смертей.

9.1.3. Вакцини з субодиноць віріонів

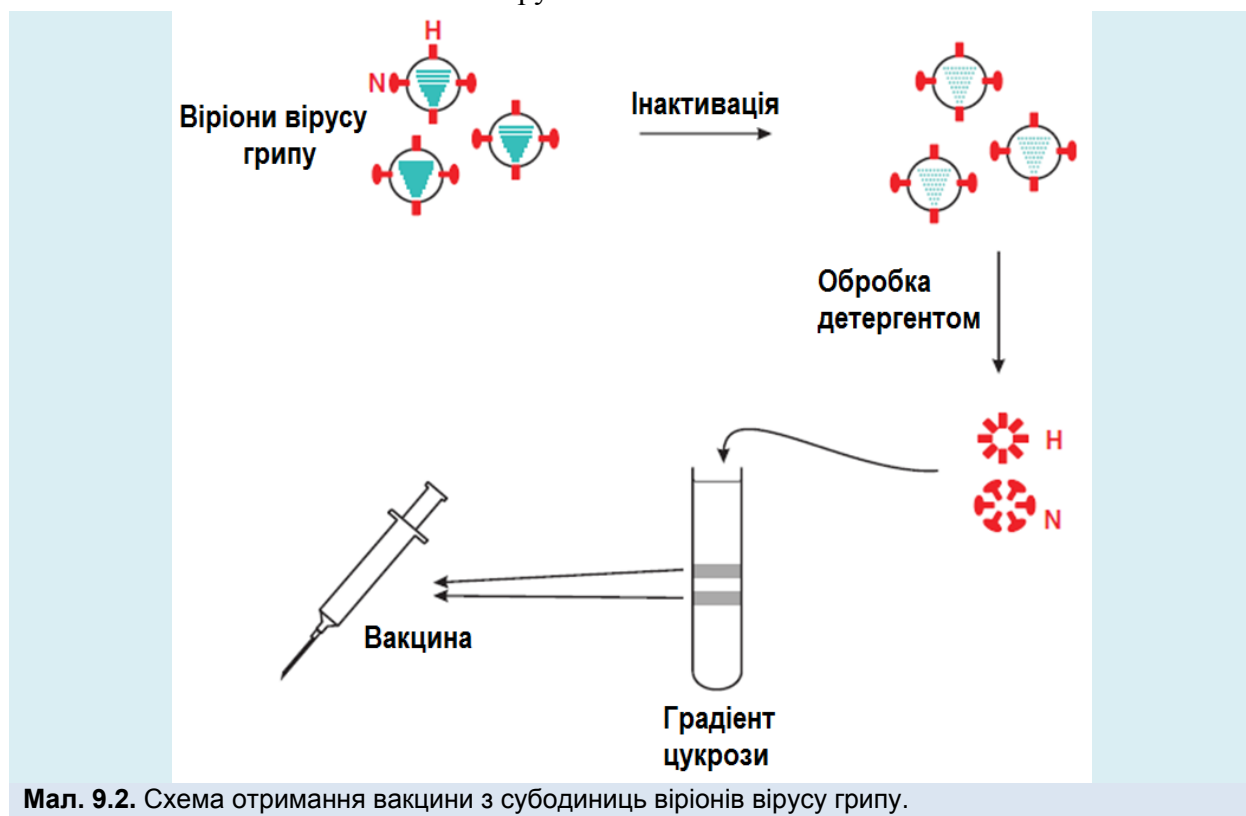
Вакцини з субодиноць віріонів містять очищені компоненти віріонів. У випадку вірусів грипу, вакцини містять поверхневі глікопротеїни гемаглютинін (H) і нейрамінідазу (N). Метод виробництва такої вакцини показаний на мал. 9.2.

Інфекційність віріонів вірусів грипу інактивується формальдегідом або β -пропіолактоном, далі оболонка віріонів видаляється обробкою детергентами, таким як Тритон X-100. Це вивільняє глікопротеїни, які очищають центрифугуванням в градієнті щільності цукрози і потім об'єднують для отримання вакцини.

Слід мати на увазі, що вакцина з субодиноць зазвичай викликає слабкішу імунну реакцію, тому для встановлення адекватного імунітету зазвичай потрібно декілька доз.

9.1.4. Використання вірусоподібних часток

Вірусоподібні частки є структурами, зібраними з вірусних білків. Ці частки нагадують віріон, проте в них немає ніякої нуклеїнової кислоти, і вони є безпечнішими, ніж вакцини з послабленими або інактивованими вірусами.



Мал. 9.2. Схема отримання вакцини з субодиноць віріонів вірусу грипу.

Саме так виготовляється вакцина проти вірусу гепатиту В. Для її виробництва використовують дріжджі, в генوم яких вставлений ген вірусного білку. Після наростання культури

трансгенних дріжджів, їх руйнують для вивільнення вірусного білку. Після очищення, молекули піддають хімічній обробці, що викликає їх агрегацію в сферичні структури, подібні до неінфекційних часток, що утворюються при зараженні вірусом гепатиту В людей.

Аналогічно отримують вакцину проти вірусу папіломи людини. Основний білок капсиду вірусу здатний до самозбирання у вірусоподібні структури, які містять епітоп, необхідний для вироблення протівірусних антитіл. Білок вірусу папіломи отримують з використанням клітин або комах, або дріжджів.

9.1.5. Вакцини, що містять синтетичні пептиди

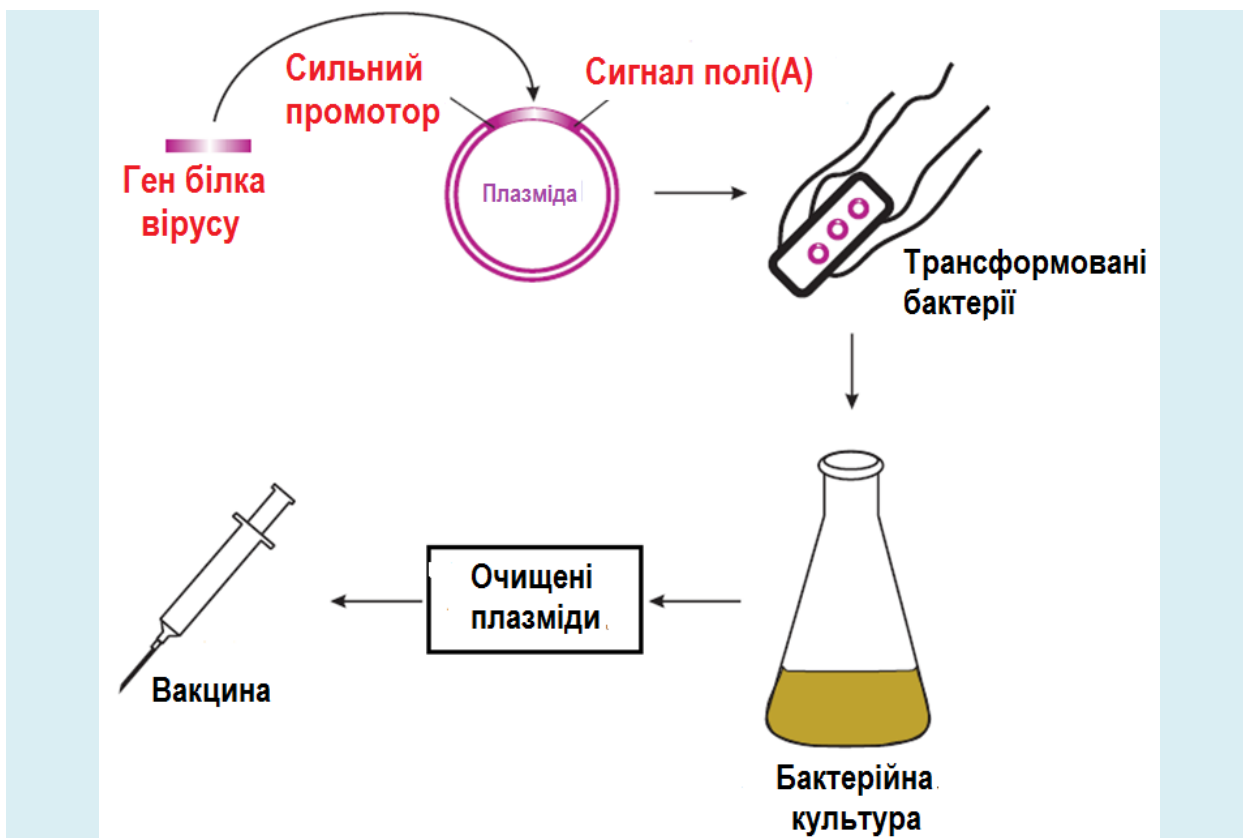
Кожен білковий антиген має один або більше епітопів. Ці короткі амінокислотні послідовності можна синтезувати штучно, і передбачається, що отримані пептиди можуть бути використані в якості вакцин. В порівнянні з традиційними вакцинами, в них легше забезпечити відсутність забруднень.

Була виконана низка робіт в спробі розробити пептидні вакцини проти вірусу ящура. У цього вірусу важливим є епітоп в межах білку VP1. Синтетичні пептиди, що мають послідовність цього епітопа, забезпечували прийнятний рівень захисних антитіл у лабораторних тварин, але при випробуваннях у тварин на фермах результати доки виявилися такими, що розчаровують.

9.1.6. Вакцини, що містять ДНК

Найбільш революційним підходом до вакцинації є введення об'єкту, що вакцинується, ДНК, яка кодує антиген, з метою викликати у вакцинованого об'єкту синтез антигена. Однією з переваг такого підходу є те, що він забезпечує стабільне виділення нового антигена для стимуляції імунної системи, як і жива вірусна вакцина. Оскільки антиген, тобто в даному випадку білок вірусу, продукується усередині клітин вакцинованого об'єкту, є вірогідним стимулювати достатню обумовлену Т-лімфоцитами імунну відповідь.

Процедура отримання ДНК-вакцини показана на мал. 9.3. Послідовність, що кодує антиген, отримують безпосередньо з ДНК-вірусів або за допомогою зворотної транскрипції з РНК-вірусів. Надалі її вставляють в плазмиду між сильним промотором і сигналом полі(А). Плазміда реплікується в клітинах бактерій і надалі очищається для використання у якості вакцини. Введення вакцини може бути проведене або ін'єкцією в м'яз, або з використанням методу генної гармати, при якому мікроскопічні частки золота, покриті ДНК, доставляється безпосередньо в клітини шкіри.



Мал. 9.3. Схема отримання ДНК-вакцини

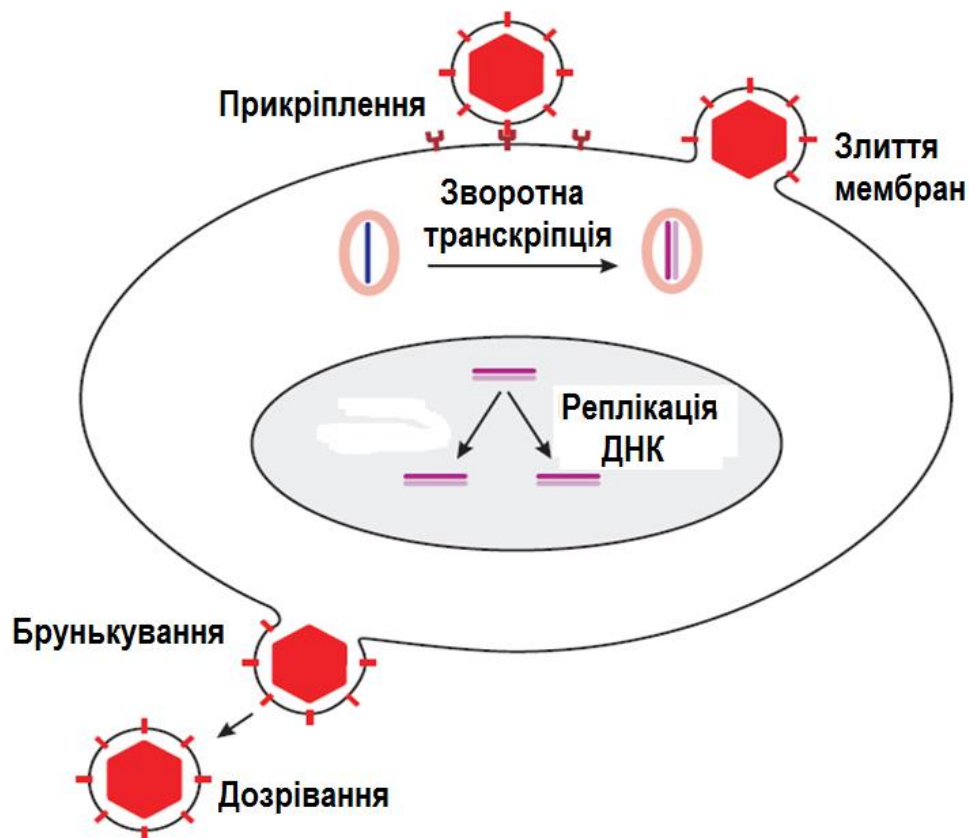
Експериментальні ДНК-вакцини були розроблені для низки вірусів, включаючи ВІЛ-1, коронавірус атипової пневмонії, вірус Західного Ніла і вірус ящура. Випробування проводили на мишах, свинях, конях і людях. Проте до того, як такі вакцини потраплять в клінічну практику, необхідно вирішити декілька проблем, пов'язаних з безпекою. Зокрема, потрібна гарантія, що введення ДНК не ініціює автоімунного захворювання, а також що ДНК, що вводиться, при вбудовуванні в геном хазяїна не викличе мутацій, що призведуть до злоякісної трансформації.

9.2. Протівірусні засоби

Впродовж тривалого часу було дуже мало протівірусних препаратів для клінічного застосування, порівняно з антибактеріальними і антигрибними ліками. Причина цього полягала в тому, що важко було знайти сполуки, які специфічно втручалися в активність, пов'язану з вірусом, і не робили значного шкідливого впливу на активність клітини-хазяїна. Останнім часом, проте, стало відомо багато специфічних для вірусів реакцій, які можуть бути об'єктами дії протівірусних засобів.

Спочатку при пошуку антивірусних препаратів проводили скринінг серед дуже великої кількості сполук, які могли б мати протівірусну активність. Процедура скринінгу включає перевірку розчинів речовин проти низки вірусів, що ростуть в клітинних культурах.

Нині створення антивірусних препаратів засноване на їх дії на певну активність вірусу (мал. 9.4). Після вибору відповідного виду діяльності вірусу, необхідно вибрати відповідний вірусний білок, який буде мішенню дії препарату, наприклад фермент вірусу. Далі визначають детальну тривимірну структуру білку, використовуючи такі методи, як рентгеноструктурна кристалографія, і в білку вибирається цільовий сайт дії. Далі з використанням комп'ютерних програм визначаються речовини, які зв'язуватимуться з цільовим сайтом і інгібуватимуть активність вірусного білку.



Мал. 9.4. Деякі стадії патогенезу вірусних інфекцій, що є потенційними мішенями протівірусних препаратів.

Слід враховувати, що препарати, які мають клінічне застосування, повинні тільки інгібувати реплікацію вірусу, але не повинні чинити шкідливої дії на хазяїна, або така дія має бути слабкою. Тому при розробках препаратів проводяться інтенсивні дослідження по впливу потенційних ліків на незаражені клітини і увесь організм. У будь-якому випадку, при концентрації, при якій потенційний протівірусний препарат досить активно інгібує реплікацію вірусів, він не повинен блокувати синтез ДНК в незаражених клітинах організму або блокувати ділення незаражених клітин.

9.2.1. Приклади антивірусних препаратів, які мають клінічне застосування

9.2.1.1. Аналоги нуклеозидів

Низка антивірусних ліків є синтетичними сполуками, структурно подібними нуклеозидам, і вони діють, втручаючись в синтез нуклеїнової кислоти вірусу. Після поглинання клітиною, аналоги нуклеозидів, подібно природним нуклеозидам, фосфорилуються і стають аналогами нуклеотидів. Таким чином, активною формою препарату є трифосфатпохідні аналогів нуклеозидів; вони діють як конкурентні інгібітори вірусної полімерази, наприклад зворотної транскриптази. При синтезі нуклеїнової кислоти, якщо один з цих аналогів нуклеотидів вбудовується в зростаючий ланцюг, синтез нуклеїнової кислоти припиняється, тому що структура аналогів нуклеотидів запобігає приєднанню наступного нуклеотиду.

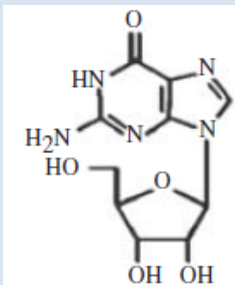
Приклади аналогів нуклеозидів. Які використовують з метою лікування вірусних інфекцій, наведені на мал. 9.5.

Рибавірин

Рибавірин є аналогом гуанозину. Він використовується для лікування інфекцій, викликаних деякими РНК-вірусами, особливо персистентної інфекції вірусу гепатиту С. Комбіноване лікування α -інтерфероном і рибавірином знищує вірус гепатиту С у багатьох пацієнтів.

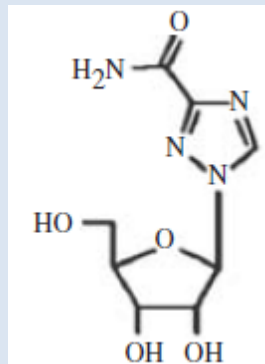
Механізм дії рибавірина не повністю зрозумілий, для його пояснення висувається ціла низка гіпотез. Препарат, як встановлено, інгібує декілька типів активності вірусу, включаючи синтез вірусною РНК і кепування мРНК, і є вірогідним, що він має більше за один спосіб дії.

Нуклеозид

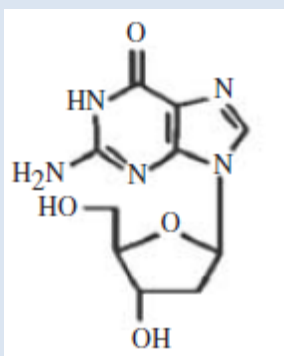


Гуанозин

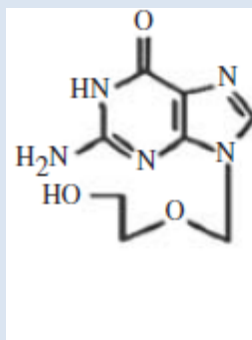
Аналог нуклеозиду



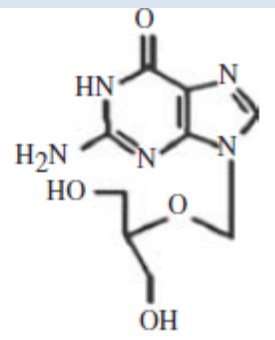
Рибавірин



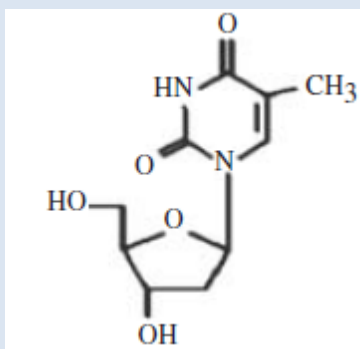
2'-Дезоксигуанозин



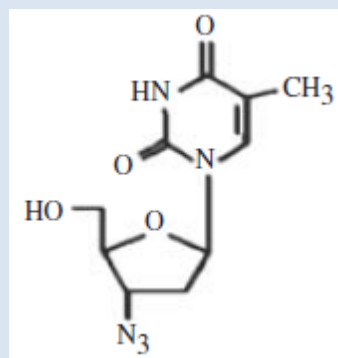
Ацикловір



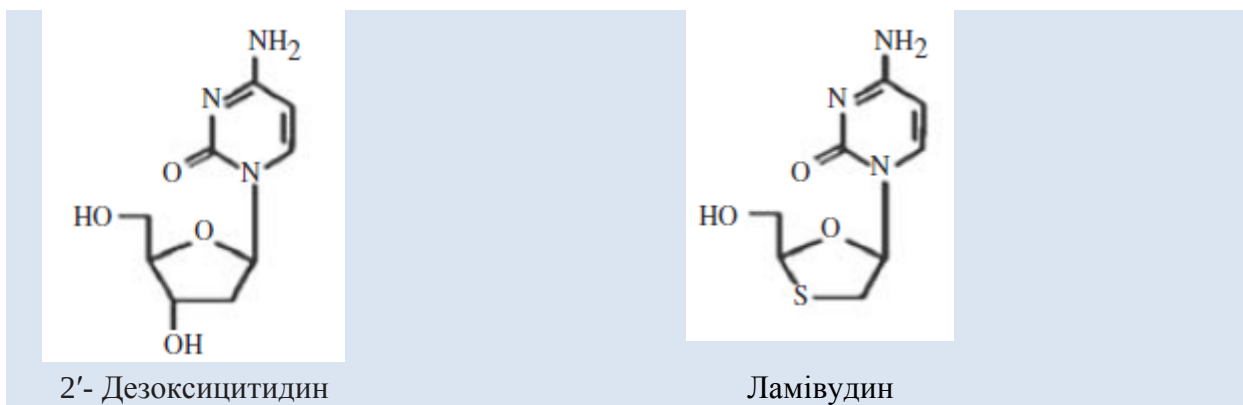
Ганцикловір



2'- Дезокситимідин



Азидотимідин



Мал. 9.5. Аналоги нуклеозидів, вживані в якості противірусних препаратів.

Аналоги нуклеозидів, які інгібують синтез ДНК вірусів герпесу

Ацикловір є аналогом гуанозину. Ці дуже безпечні ліки, з практично відсутніми побічними ефектами. Його використовують для лікування і профілактики захворювань, викликаних вірусами простого герпесу 1 і 2 і вірусом вітрянки. Його застосування запобігає появі лихоманки і висипань, знижує смертність при викликаному герпесвірусами енцефаліті і значно знижує прояв оперізувального лишаю.

Ацикловір значно інгібує синтез ДНК вірусу, але справляє дуже слабкий ефект на синтез ДНК клітини. У заражених герпесвірусами клітинах, перше фосфорилування ацикловіру здійснюється вірусною тимідинкіназою. Тимідинкінази клітини з'являються тільки на певних стадіях клітинного циклу і мають набагато меншу спорідненість до ацикловіру, ніж фермент вірусу, тому фосфорилування акцикловіру в незаражених клітинах практично не відбувається.

Впродовж синтезу ДНК, трифосфат акцикловіру конкурує з дезоксигуанозинтрифосфатом за включення в ланцюг, що синтезується. Коли він вставляється, синтез ДНК припиняється, оскільки у нього відсутня 3'-ОН група

Ганцикловір, як і ацикловір, є аналогом гуанозину, і перше його фосфорилування в клітині виконується протеїнкіназою вірусу. Проте включення ганцикловіру в ДНК клітини значно ймовірніше, ніж включення акцикловіру, внаслідок чого ганцикловір має значні побічні ефекти, зокрема викликає зниження кількості клітин крові через пошкодження клітин кісткового мозку. Ганцикловір використовують для боротьби із зараженням цитомегаловірусом, стосовно якого акцикловір є менш ефективним.

Аналоги нуклеозидів, які інгібують зворотну транскрипцію

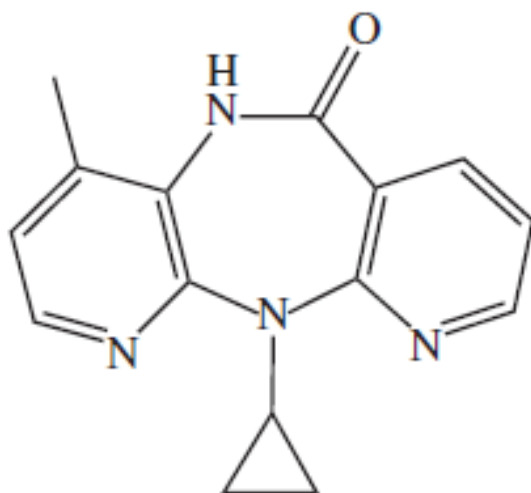
Аналогом тимідину є азидотимідин. Він досліджувався як протипухлинні ліки, і було виявлено, що він інгібує зворотну транскриптазу ВІЛ. Як і інші аналогів нуклеозидів, він фосфорилується до трифосфату після поглинання клітиною. Азидотимідин трифосфат сильніше зв'язується із зворотною транскриптазою вірусу, ніж з ДНК-полімеразою клітини, і зворотна транскриптаза переважно включає до складу ДНК саме його, а не дезокситимідинтрифосфат. Таким чином, азидотимідин інгібує зворотну транскриптазу ВІЛ. Проте він все-таки втручається в синтез клітинної ДНК, і аналогічно ганцикловіру, може пошкодити клітини кісткового мозку.

Є також ряд інших аналогів нуклеозидів (наприклад ламівудин), які інгібують зворотну транскриптазу ВІЛ і вірусу гепатиту В.

9.2.1.2. Не нуклеозидні інгібітори зворотної транскрипції

З використанням підходу раціонального дизайну, були розроблені декілька не нуклеози-

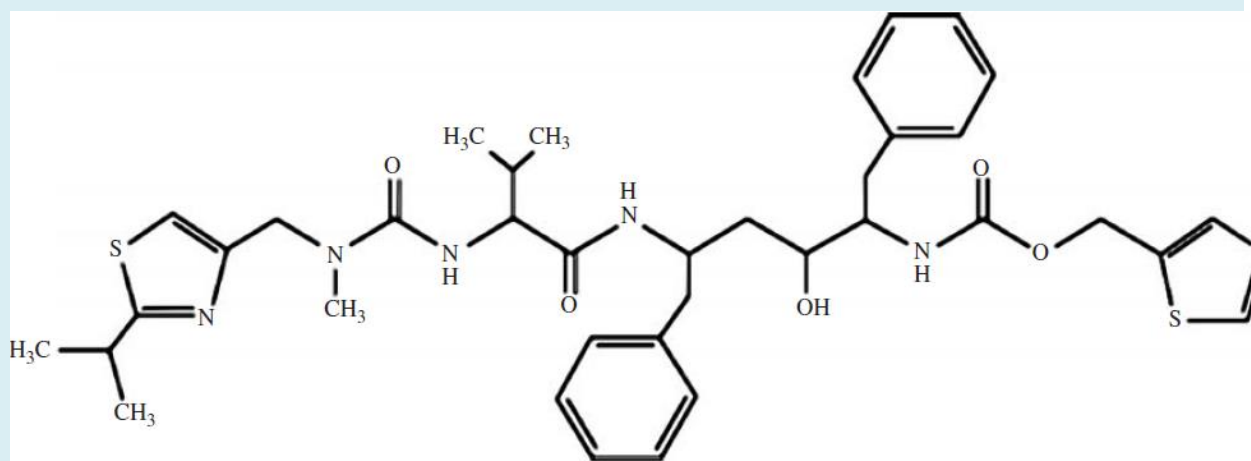
дних інгібіторів зворотної транскриптази ВІЛ. Ці інгібітори мають інші цільові сайти зворотної транскриптази в порівнянні з аналогами нуклеозидов. Прикладом не нуклеозидного інгібітору зворотної транскрипції є невірапін (мал. 9.6). З'єднуючись зі зворотною транскриптазою, блокує активність РНК-залежної і ДНК-залежної полімерази.



Мал. 9.6. Невірапін - інгібітор зворотної транскриптази ВІЛ, який не є аналогом нуклеозидів.

9.2.1.3. Інгібітори протеази ВІЛ

Дозрівання віріонів ретровірусів включає розрізання вірусною протеазою білків Gag і Gag-Pol з утворенням білків віріонів. Продукти розрізання білка Gag формують матрикс, а білка Gag-Pol є ферментами віріона. Якщо розрізання не відбувається, віріони ВІЛ не стають інфекційними. Були розроблені пептиди, які імітують сайти розрізання білків, і ці продукти зв'язуються з активним сайтом протеази ВІЛ. Внаслідок такого зв'язування від заражених ВІЛ клітин відбруньковується мало віріонів, а віріони, що відбрунькувалися, є неінфекційними. Прикладом інгібітору протеази ВІЛ є ритонавір (мал. 9.7).



Мал. 9.7. Ритонавір - пептидний інгібітор протеази ВІЛ.

9.2.1.4. Інгібітори злиття ВІЛ

Після того, як віріон ВІЛ-1 зв'яжеться з рецептором, трансмембранний глікопротеїн gp41 повинен забезпечити злиття ліпідної оболонки віріона з мембраною клітини, щоб вміст віріона міг вивільнитися в цитоплазму. Для того, щоб це сталося, gp41 зазнає ряд конформаційних змін, які ініціюються зв'язуванням вірусу з рецептором і корецепторами на поверхні клітини.

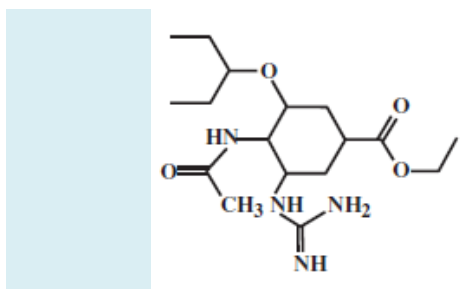
Була розроблена низка ліків, які інгібують злиття мембран ВІЛ-1 і потенційною клітини-

хазяїна. Вони зв'язуються з gp41 і інгібують конформаційні зміни. Прикладом такого препарату є енфувіртид, що складається з 36 амінокислот, який зв'язується з послідовністю в регіоні gp41, який взаємодіє з іншою послідовністю gp41, викликаючи конформаційні зміни. Такими чином, на відміну від інших засобів, діючих проти ВІЛ, енфувіртид запобігає зараженню клітин ВІЛ-1. Набагато менш активним препарат є щодо ВІЛ-2, трансмембранний глікопротеїн якого тільки віддалено споріднений глікопротеїну ВІЛ-1. Одним з недоліків енфувіртиду є те, що він повинен вводитися у вигляді підшкірних ін'єкцій, тоді як інші препарати для боротьби з ВІЛ приймаються оральним шляхом.

9.2.1.5. Інгібітори нейрамінідази вірусів грипу

Одним з поверхневих білків вірусів грипу типу А і В є нейрамінідаза. Цей фермент грає ключову роль впродовж завершальної стадії брунькування віріонів на заражених клітинах; у випадку інгібування ферменту, віріони не вивільняються. Кожен виступ нейрамінідази на поверхні віріона складається з чотирьох мономерів, кожен з яких у свою чергу складається з "кульки" на "паличці".

У 1983 році нейрамінідаза вірусу грипу була отримана в кристалічному вигляді, і була визначена її структура. Було встановлено, що мономер має глибоку щілину, і що ця щілина є активним сайтом ферменту. Були розроблені сполуки, які зв'язуються з щілиною, і низка з цих сполук інгібує активність нейрамінідази. Одна з таких сполук, озельтамівір (відомий також під патентованою назвою Таміфлю), використовується як ліки проти вірусу грипу (мал. 9.8).



Мал. 9.8. Озельтамівір – інгібітор нейрамінідази вірусу грипу.

9.2.2. Стійкість вірусів до антивірусних препаратів

Незабаром після введення антивірусних препаратів в клінічну практику, почали з'являтися стійкі до препаратів штами вірусів. Подібно до стійких до антибіотиків штамів бактерій і стійких до пестицидів шкідливих організмів, це стало результатом тиску добору. Таким чином, почали швидко виникати стійкі генотипи вірусів, особливо РНК-геномних вірусів, і такі генотипи отримували селективну перевагу і ставали домінантними в організмі хазяїна, в якому були присутніми ліки.

Стійкі штами вірусів мають одну або більше мутацій в генах, які кодують білки, що є мішенями для антивірусних ліків. У гені зворотної транскриптази ВІЛ-1 мутації, що забезпечують стійкість до аналогів нуклеозидів і до інгібіторів не нуклеозидної природи, відбуваються в різних кодонах. Деякі мутації забезпечують множинну стійкість, тобто стійкість до різних типів ліків. Більшість мутацій, спостережуваних у ВІЛ-1, є замінами амінокислот; проте деякі мутації являються делеціями або інсерціями.

Виникнення стійких штамів вірусу являє клінічну проблему. У такому випадку необхідно застосовувати альтернативні ліки. Нині стандарт лікування інфекції ВІЛ передбачає використання декількох препаратів в комбінації. Наприклад, можуть використовуватися

два інгібітори зворотної транскриптази і інгібітор протеази. Вірогідність появи в організмі хворого штаму вірусу, одночасно стійкого до усіх ліків, дуже мала. Такий підхід називають високоактивною антиретровірусною терапією (ВААРТ). ВААРТ не звільнює тіло пацієнта від ВІЛ-інфекції: персистентна інфекція зберігається в латентній формі в заражених макрофагах і CD4 Т-клітинах пам'яті і деяких інших схованках, де інфіковані клітини можуть уникнути дії противірусного препарату і/або імунної реакції організму. Але ВААРТ значно знижує смертність від СНІДу у розвинених країнах і ризик передачі ВІЛ дитині від ВІЛ-інфікованої матері.

9.2.3. Розробка антивірусних препаратів

Окрім появи стійких до ліків штамів вірусів, є інші проблеми, пов'язані з антивірусною терапією. Так, більшість ліків не видаляє вірус з тіла пацієнта, і багато лікарських препаратів мають значні побічні ефекти. Для багатьох вірусних хвороб взагалі досі не розроблені відповідні засоби лікування. З цієї причини дослідження в області розробки нових антивірусних препаратів активно проводяться; зокрема, шукаються можливості використання активації антивірусного захисту самого організму, зокрема в цьому плані дуже привабливим виглядає сайленсінг РНК.

Додаткове читання до глави 9.

1. Глава IV. Противовирусные препараты в кн. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.
2. Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л. Противовирусные препараты для лечения орви и гриппа у детей (клинический обзор) // Фундаментальные исследования. – 2010. – №9. – С. 76–87.
3. Antonelli G., Turriziani O. Antiviral therapy: old and current issues // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2012. – V.40, №2. – P.95–102.
4. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies // Nat Rev Microbiol. – 2004. – V.2, №9. P. 704–720.
5. De Clercq E. Antiretroviral drugs // Curr. Opin. Pharmacol. – 2010. – V. 10, №5. – P. 507–515.
6. Silva J.M.; Hammond S.M.; Hannon G.J. RNA interference: a promising approach to antiviral therapy? // Trends in Molec. Med. – 2002. – V.8, № 11. P. 505–508.
7. Simons C., Wu Q., Htar T.T. Recent advances in antiviral nucleoside and nucleotide therapeutics // Curr. Top. Med. Chem. – 2005. – V.5, №13. – P.1191–1203.

Глава 10. Патогенез захворювань, що викликаються пріонами

Деякі інфекційні хвороби людини і тварин викликаються інфекційними агентами, що були названі пріонами. Пріони не є вірусами, однак більшість присвячених пріонам досліджень публікуються в журналах, з проблем вірусології; пріони фактично «за умовчанням» були віднесені до царини вірусології. Збудниками пріонних хвороб є білкові молекули, які мають походження від білків клітини; з ними не пов'язані жодні нуклеїнові кислоти.

Для захворювань, що викликаються пріонами, є характерним дуже тривалий інкубаційний період, вимірюваний роками. Ознаки захворювання, викликаного пріонами, включають недоумство і втрату координації, пацієнт деградує з неминучою смертю.

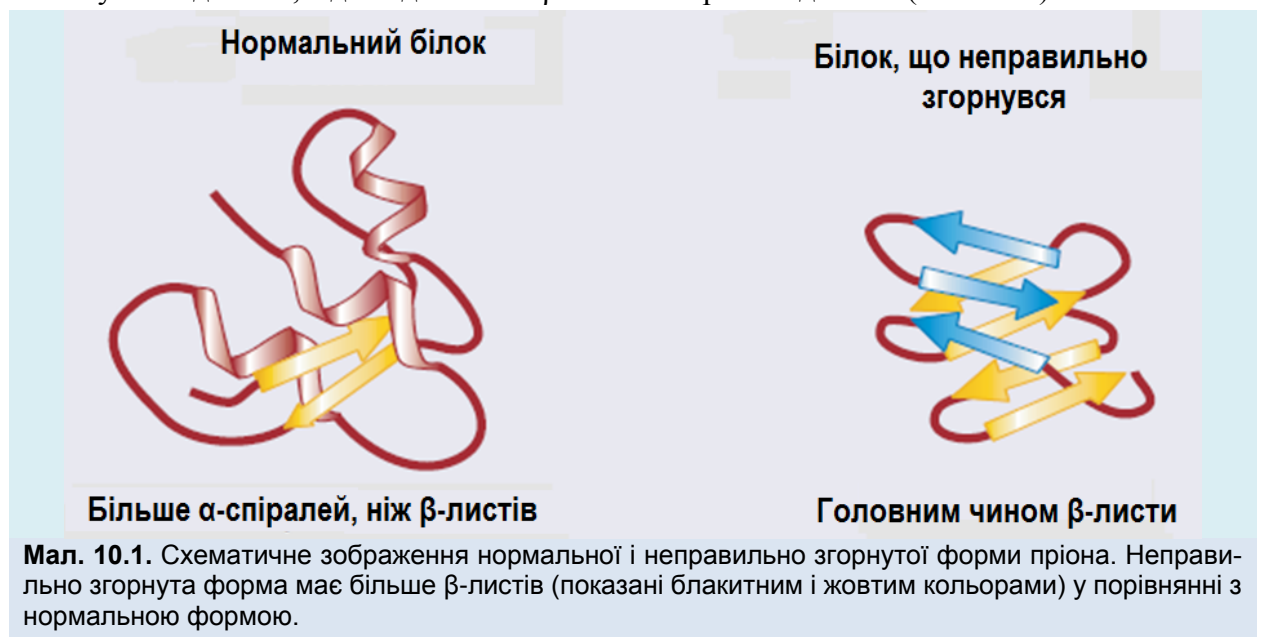
Хвороби, що викликаються пріонами, носять назву трансмісивні губчасті енцефалопатії (ТГЕ). Слово "енцефалопатія" означає захворювання мозку. Слово "губчаста" пов'язане з формуванням отворів в мозку, який виглядає як губка. Нарешті, слово "трансмісивні" означає, що захворювання може передаватися за допомогою інфекційного агента від однієї особини цього виду іншій особини цього ж виду, або іноді від особини одного виду особині іншого виду.

10.1. Природа пріонів

Інфекційні агенти, які викликають ТГЕ, не містять нуклеїнових кислот; вони є формами нормального білку клітини, що неправильно згорнулися. Ця «тільки білкова» гіпотеза була запропонована американським лікарем Стенлі Прузінером (Stanley Prusiner), який і запропонував термін «пріони» (від англ. proteinaceous infectious particles – білкові заразні частинки).

Версії нормального білку клітини були знайдені у ссавців, птахів і рептилій; у людини цей білок кодується геном *Prnp*. Роль нормальної форми білку в клітині досі не зовсім ясна. Він циклічно переміщається між ендосомами і поверхнею клітини, де він «заякорюється» в плазматичній мембрані за рахунок гідрофобного якоря на С-кінці. Він знайдений у багатьох типах клітин, але особливо щедрий в клітинах центральної нервової системи.

У нормальній формі білок має вторинну структуру, яка містить 42% α -спіралей і 3% β -листів, тоді як у вигляді форми, що неправильно згорнулася, доля ділянок з α -спіралями зменшується до 30%, а доля ділянок з β -листами зростає до 43% (мал. 10.1).

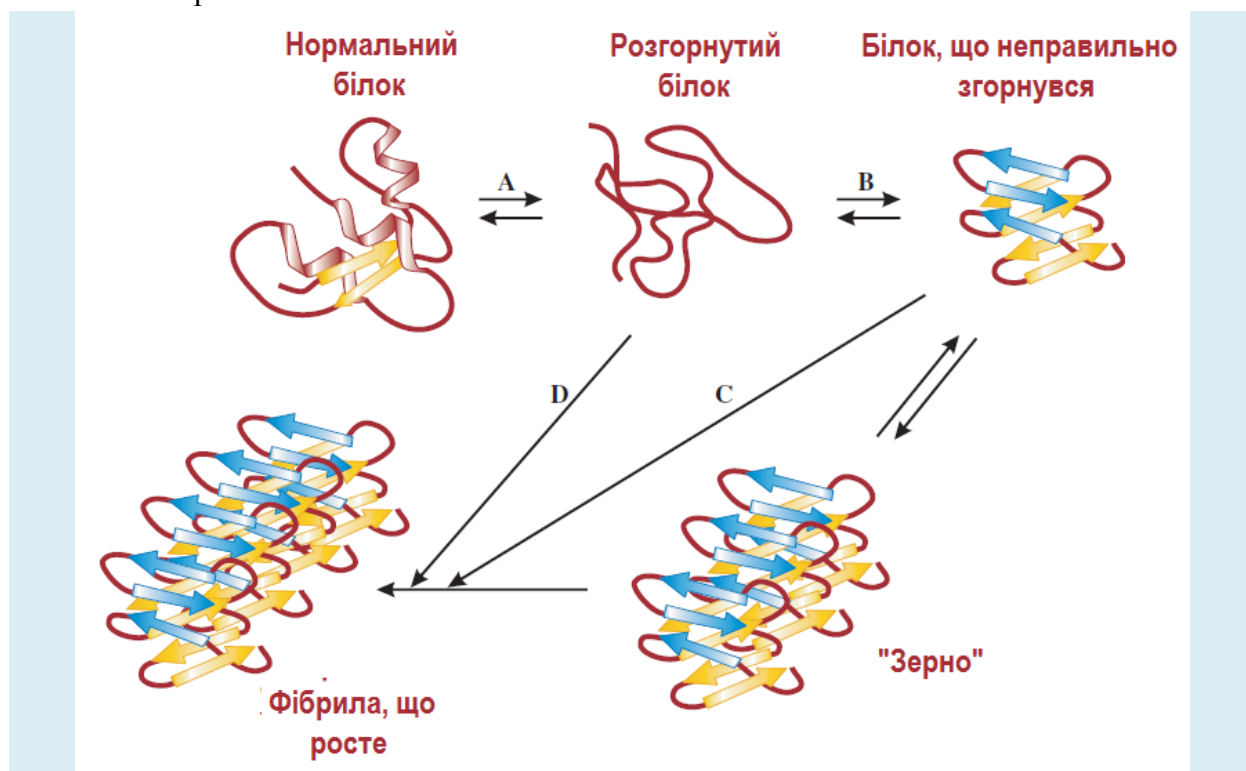


Така зміна конформації супроводжується зміною властивостей білку. Якщо нормальний білок повністю руйнується протеїназою К, то білок, що неправильно згорнувся, високо стійкий до дії ферменту. Помилкове згортання також робить білок нерозчинним в неіонних детергентах. У тканинах, що містять пріони, молекули білків, що неправильно згорнулися, формують агрегати у вигляді фібрил, паличок або інших форм, залежно від виду хазяїна і штаму пріона.

Щодо нормальної форми білків і форми білків, що неправильно згорнулися, використовуються різні позначення. Нормальний білок зазвичай означають як PrP^c (PrP = prion protein; c = cell), тоді як форму, що неправильно згорнулася, означають як PrP^{Sc} (Sc = scrapie) або як PrP^{res} (res = resistant to proteinase).

Механізм, за допомогою якого пріон «реплікується», є незрозумілим. Білок, що неправильно згорнувся, якимось чином викликає неправильне згортання нормальних білків клітини, але як саме це відбувається, залишається невідомим.

Передбачається, що ініціація процесу реплікації пріона вимагає чогось на кшталт «зерна», яке являє собою агрегат декількох молекул неправильно згорнутого білку (мал. 10.2). Таке «зерно» може бути сформоване після зараження пріонами, або після дуже рідко спостережуваної конформаційної зміни нормальної молекули, або як результат експресії мутантного гена пріона.



Мал. 10.2. Модель реплікації пріонів. Копії нормального білку розгортаються (A) і знову згортаються у форму, яка представлена головним чином β -листами (показані блакитним і жовтим кольорами). Реплікація може потребувати «зерна» критичного розміру. Приєднання до такого зерна неправильно згорнутих (C) або розгорнутих (D) молекул призводить до незворотності процесу.

Молекули білку, що неправильно згорнувся, накопичуються в ендосомах і лізосомах, що особливо виражено в нервових клітинах. При деяких пріонних захворюваннях такий білок виявляється також в інших органах і тканинах, включаючи селезінку і лімфатичні вузли.

Інфекційність пріонів зберігається при нагріванні, вона в деякій мірі зберігається навіть після автоклавування впродовж тривалого часу. Окрім цього, пріони стійкі також по відношенню до багатьох інших типів обробок.

10.2. Захворювання, що викликаються пріонами,

У одних випадках пов'язане з пріонами захворювання виникає спонтанно, в інших випадках успадковується, і інколи отримується внаслідок попадання інфекційного агента в тіло. У випадку попадання пріонів в тіло, найчастіше вони потрапляють в шлунково-кишковий тракт, надалі через тонкий кишковик потрапляють в організм і транспортуються в лімфотікулярну систему (тобто селезінку, лімфатичні вузли), де молекули ампліфікуються. З цих ділянок вони можуть бути перенесені в центральну нервову систему.

Реплікація пріонів відбувається повільно, проте оскільки білки, що неправильно згорнулися, не руйнуються, їх концентрація поступово зростає. Молекули формують нерозчинні агрегати, накопичення яких призводить до порушення функцій і загибелі нервових клітин. Внаслідок цих подій утворюються порожнини і отвори в тканині мозку. Неминучим результатом є смерть хазяїна пріонів.

10.2.1. Захворювання тварин

Скрепі, що також зветься «вертячка», «почесуха», «трясучка», є відомою в Європі впродовж сотень років хворобою овець. Багато хворих тварини починали чухатися об тверді об'єкти, наприклад об стовпи загорож, звідки і сталася назва хвороби (англ. scrapie, від scrape – шкребти). Хворі тварини скрипіли зубами, спотикалися і падали, і врешті-решт помирали. У 1930-х роках було показано, що скрепі може бути передана від вівці до вівці за допомогою введення тканини мозку.

У США в 1947 році була вперше описана трансмісивна губчаста енцефалопатія у норок, що розводилися на фермі, згодом у кінці 1980-х років хронічна хвороба, що виснажує, була описана у чернохвостих оленів і лосів, що утримувалися в неволі. Надалі це захворювання було виявлене у диких чернохвостих оленів, білохвостих оленів і лосів; воно є єдиною формою ТГЭ у тварин, що живуть в дикій природі.

Губчаста енцефалопатія корів, або коров'ячий сказ, уперше було описано у Великобританії в 1986 році, і незабаром стався спалах цього захворювання. Хвороба поширювалася шляхом використання для корму великої рогатої худоби м'ясо-костного борошна в якості джерела білку, яке виробляли з частин тіл хворих тварин. Це і призвело до широкого поширення хвороби. Зовні здорові корови могли фактично містити великі кількості молекул білку, що неправильно згорнулися, в головному і спинному мозку. Залишається невідомим, чи мав початковий інфекційний матеріал стосунок до овець, хворих скрепі, або він належав коровам, у яких захворювання виникло спонтанно.

Коров'ячий сказ був експортований з Великобританії в живих коровах, а також ймовірно в м'ясо-костному борошні, що експортується. Надалі про губчасту енцефалопатію корів повідомляли у багатьох країнах світу. У ранній період спалаху коров'ячого сказу про губчасту енцефалопатію повідомляли у багатьох домашніх тварин, що містяться в неволі, включаючи домашніх кішок, пум і тигрів, а також бізонів і антилоп. Ймовірно, ці випадки були результатом годування тварин м'ясом і м'ясо-костним борошном корів, хворих на коров'ячий сказ.

10.2.2. Захворювання у людей

У людей низка захворювань, що викликаються пріонами, підрозділяється на три категорії: спонтанні, спадкові і придбані. Приклади наведені у таблиці нижче.

Категорія хвороби	Приклад
Спонтанні	Спорадична ХКЯ*
Спадкові	Сімейна форма ХКЯ Фатальне сімейне безсоння
Придбані	Куру Варіант ХКЯ
*ХКЯ – Хвороба Крейтцфельда–Якоба (Creutzfeldt-Jakob disease).	

Спорадична хвороба Крейтцфельда–Якоба є найбільш поширеною і зустрічається з частотою близько 1,7 випадків на мільйон осіб на рік. Спадкові пріонні хвороби мають високу частоту виникнення в сім'ях, у яких геноми кодують певні амінокислоти в деяких кодонах гена *Prnp*.

Куру і варіант ХКЯ набуваються через використання продуктів з пріонами в їжу. Куру – хвороба, що зустрічалась майже виключно у високогірних районах Нової Гвінеї у аборигенів племені форі, уперше була виявлена на початку XX століття. У 1950-х роках Деніел Карлтон Гайдушек (Daniel Carleton Gajdusek) розкрив інфекційну природу куру. Живучи довгий час серед аборигенів племені і вивчаючи цю хворобу, він пов'язав появу захворювання з традицією канібалізму – поїдання мозку померлих. Він вважав, що куру викликається «латентним вірусом». Проте пізніше з'ясувалося, що інфекційний агент куру – пріон, тобто нормальний білок організму, що прийняв патогенні властивості через зміни конформації.

Варіант ХКЯ є відносно новою хворобою. Перший випадок цього захворювання стався у Великобританії в 1995 році, коли померла молода людина. Після цього трапилася низка випадків захворювання, у тому числі і за межами Великобританії. Не було ніяких доказів, що ці випадки обумовлені спадковою формою пріонного захворювання, також вони відрізнялися від спорадичної форми. Надалі було встановлено, що пріони, які викликають коров'ячий сказ, за молекулярними характеристиками відповідні пріонам, що викликають варіант ХКЯ. Було висловлено припущення, що це захворювання спостерігалось у людей, що використали в їжу м'ясо хворих корів, і пріон, що викликає губчасту енцефалопатію корів, є збудником варіанту ХКЯ. Декілька випадків цього захворювання, як вважають, було пов'язано не із вживанням м'яса, а з переливанням крові хворих людей здоровим.

10.2.3. Штами пріонів і їх передавання

Для деяких агентів, що викликають трансмісивні губчасті енцефалопатії, була диференційована низка штамів, кожен з яких мав фенотипічні особливості, що стійко передаються від покоління до покоління. Наприклад, різні штами агента скріпи можуть індукувати різні клінічні синдроми у кіз. Відмінності також виявляються при лабораторних дослідженнях, в яких пріон можна диференціювати за такими властивостями, як інкубаційний період у мишей після введення в мозок і ступеня стійкості до нагрівання.

Штами вірусів розрізняються по послідовностях нуклеїнових кислот. Пріони не мають нуклеїнових кислот. Тому виникає питання, чим обумовлені відмінності між штамами пріонів? Одне з передбачуваних пояснень полягає в тому, що пріон може мати декілька варіантів неправильного згортання, і кожен з варіантів представляє штам пріона. Альтернативне пояснення полягає в тому, що штами пріонів можуть розрізнятися в ступені глікозилювання

в двох сайтах глікозилювання, так що пріон може існувати в трьох формах: неглікозильованій, моноглікозильованій і діглікозильованій. Цукри в сайтах глікозилювання можуть бути різними.

Пріони можуть бути перенесені в інших членів одного виду і часто інших видів. Ефективність перенесення залежить від входу, через який молекули пріонів потрапляють в тіло; ін'єкція в мозок набагато ефективніша, ніж поглинання з їжею. Також ефективність перенесення залежить від дози – чим вище доза пріона, тим більше вірогідне перенесення.

Іншим чинником, який впливає на ефективність перенесення пріонів, є існування невеликих варіацій в послідовності гена пріона, які призводять до варіації в сприйнятливості між генотипами. Присутність певних амінокислот в певних позиціях можуть зробити окремі особини більш або менш сприйнятливими. Наприклад, вівці сприйнятливіші до скрепі, якщо ген пріона кодує в положенні 136 валін, а не аланін. Невеликі варіації в послідовності гена пріона також чинять значну дію на інкубаційний період і клінічний перебіг захворювання.

Численні спроби передати агентів трансмісивної губчастої енцефалопатії віддалено спорідненим видам тварин показали, що це складне завдання. У тих випадках, коли передача вдавалася, мінімальна інфекційна доза була вища, а інкубаційний період довший, ніж при передачі пріона близьким видам. Це явище було назване «видовим бар'єром». Проте слід врахувати, що успішність передачі пріона оцінювали по прояву симптомів захворювання. Проте є докази, що в деяких випадках відбувалося безсимптомне зараження, і пріон реплікувався в організмі тварини до закінчення життя зараженої тварини. Інакше кажучи, тривалість життя зараженої тварини виявлялася менше, ніж того вимагав інкубаційний період хвороби. З цієї причини не виключено, що сила "міжвидового бар'єру" при передачі пріонів переоцінюється.

Якщо пріон переноситься в інший вид тварини і потім переноситься на особини цього ж виду, то з кожним пасажом інкубаційний період стає коротше, поки не стабілізується на певному рівні. Слід брати до уваги, що кожен вид тварин має свій специфічний білок-пріон, і при попаданні в хазяїна іншого виду початковий пріон примушує неправильно згортатися дещо інший по амінокислотній послідовності білок.

Перенесення інфекційного агента коров'ячого сказу від корів людям у вигляді варіанту ХКЯ свідчить про подолання видового бар'єру. Про це ж свідчить захворювання домашніх кішок, а також інших видів тварин, які відбувалися під час спалаху коров'ячого сказу у Великобританії. В той же час випадків переходу інфекційного агента, що викликає скрепи у овець, на людину зафіксовано не було. Таким чином, в якому ступені видовий бар'єр може захистити від перенесення пріонів між видами, залишається дискусійним питанням.

У природі пріонів і хвороб, що викликаються ними, залишається дуже багато неясного. Одна із причин, які стримують науковий прогрес в цій галузі – надзвичайно довгий інкубаційний період хвороби.

Додаткове читання до глави 10.

1. Григорьев В.Б. Прионные болезни человека и животных // Вопросы вирусологии.– 2004.–Т.49, №5.– С.4–12
2. Переседова А.В., Завалишин И.А. Болезнь Крейтцфельда-Якоба: современные аспекты проблемы (обзор литературы) // Анналы клинич. и эксперимент. неврологии – 2012.– Т.6, №1.– С. 57–63.
3. Шкундина И.С., Тер-Аванесян М.Д.. Прионы // Успехи биологич. химии.–2006.– Т. 46, №1. С.3–42.

4. Caughey B., Baron G.S. Prions and their partners in crime // Nature.– 2006.–V.19, №443(7113). P. 803–810.
5. Priola S.A., Vorberg I. Molecular aspects of disease pathogenesis in the transmissible spongiform encephalopathies // Mol. Biotechnol. – 2006.–V.33, №1.–P.71–88.
6. Soto C., Estrada L., Castilla J. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates // Trends Biochem. Sci. –2006.–V.31, №3.–P. 150–155.

Глава 11. Походження і еволюція вірусів

Походження і еволюція багатьох клітинних організмів передбачаються на підставі вивчення викопних залишків. Проте стосовно вірусів, викопних залишків фактично немає. Через це питання походження вірусів є значною мірою умоглядним. Це ж стосується і еволюції вірусів, хоча останніми роками використання сучасних методів досліджень дозволяє будувати філогенетичні дерева і пропонувати раціональні пояснення механізмам еволюції вірусів.

11.1. Походження вірусів

Віруси за визначенням є молекулярними паразитами клітини, тому до виникнення клітин віруси не могли з'явитися. Вважається, що перші викопні залишки, по яких встановлена наявність живих клітин, мають вік близько 3,9 млрд. років. Розумно припустити, що перші клітини з'явилися за декілька сотень мільйонів років до цього. Багато біологів вважають, що до появи цих примітивних прокаріотів, була фаза еволюції, яка включала еволюцію органічних молекул. Цими молекулами, можливо, були білки і РНК, і деякі з РНК придбали здатність до самореplikації.

Археї і бактерії, що мешкають на земній кулі сьогодні, є прокаріотичними нащадками первинних клітин. Є можливим, що віруси з'явилися вже на ранній стадії еволюції цих примітивних прокаріот, але в якій мірі віруси сучасних прокаріот нагадують ці ранні віруси древніх прокаріот, залишається невідомим.

Еукаріотичні клітини з'явилися набагато пізніше, тому часова шкала вірусів, вражаючих еукаріот, є набагато сучаснішою, ніж для вірусів прокаріот.

У відповідь на питання, звідки сталися віруси, поки можна дати тільки одну певну відповідь: загалом, це залишається невідомим. На рівні припущень, згадуються три можливі предки вірусів. У число них входять:

1. Молекулярні попередники клітинних організмів.
2. Компоненти клітин.
3. Внутрішньоклітинні мікроорганізми.

Відносно походження вірусів, відповідно є три основні гіпотези, кожна з яких пов'язана з одним з трьох потенційних предків вірусів.

11.1.1. Молекулярні попередники клітинних організмів

Вважається, що в ранній історії розвитку Землі, перед появою клітинних організмів, еволюціонували молекули РНК, у яких з'явилася ферментативна активність (рибозими) і здатність до самореplikації. Після появи перших живих клітин, в деяких з них могли паразитувати декотрі з цих молекул РНК. Якщо таке дійсно сталося, то аналогічні молекули РНК були першими вірусами.

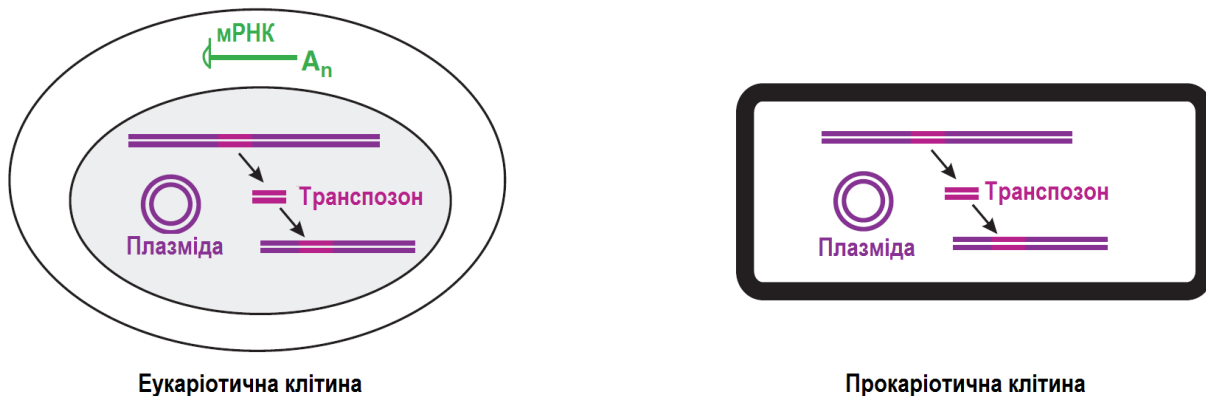
11.1.2. Мобільні компоненти клітини

Можливо деякі клітинні компоненти розвинули здатність реплікуватися самостійно, незалежно від контролю з боку клітини-хазяїна, і таким чином стали паразитами клітини. До цих потенційних кандидатів на попередників вірусів входять молекули мРНК, а також такі молекули ДНК, як плазмідні і транспозони (мал. 11.1).

Геноми багатьох (+)РНК-вірусів еукаріот мають характеристики клітинних мРНК, наприклад кеп на 5'-кінці і послідовність полі(А) на 3'-кінці. Можливо, деякі РНК-віруси є нащадками клітинних мРНК?

Ковалентно замкнуті в кільце молекули ДНК, відомі як плазмідні, виявлені в клітинах

прокаріот і еукаріот. Чи можуть деякі ДНК-віруси бути нащадками таких молекул? Декотрі бактерійні плазмиди несуть гени, які специфікують утворення білкових трубок (пілей), які можуть прикріплюватися до іншої бактерії і дозволяють переходити плазмідам з однієї клітини в іншу. Чи можуть бактеріофаги, наприклад нитчасті фаги або фаги з хвостами, бути нащадками древніх плазмід і їх пілей? З іншого боку, передбачається, що пілі сучасних бактерій мають походження від нитчастих фагів!



Мал. 11.1. Компоненти клітин, що є кандидатами в попередники вірусів

Транспозони є мобільними послідовностями ДНК в геномах прокаріот і еукаріот. Вони названі мобільними тому, що можуть переміщатися з однієї ділянки генома в іншу за допомогою механізмів «вирізати і вставити» або «скопіювати і вставити». Можливо деякі ДНК-віруси є нащадками транспозонів.

Для того, щоб стати вірусами, ДНК транспозонів повинна була якимсь чином придбати низку генів, включаючи гени, що кодують білок або білки капсиду, а також у багатьох випадках гени полімераз для реплікації вірусних геномів.

Особливим класом клітинних компонентів, які належать до дуже вірогідних попередників вірусів, є ретротранспозони. Вони мають подібні ретровірусам послідовності в геномах еукаріот (розділи 4.3.3.1, 7.6.1). Ретротранспозони складаються з двох довгих термінальних повторів, які фланкують гени *gag*, *pol* і інколи *env* (мал.11.2). Таким чином, ретротранспозони нагадують провіруси ретровірусів. Вони реплікуються за допомогою транскрипції мРНК, яка потім транслюється у білки Gag і Gag-Pol. Далі шляхом зворотної транскрипції утворюються нові копії транспозонів, які можуть вставитися в інші сайти клітинного генома. Ретротранспозони знайдені в геномах хребетних і безхребетних тварин, рослин і грибів.

		Довжина	Кількість копій у геномі людини
Автономні		6-11 т.п.н.	} 450 000
Неавтономні		1,5-3 т.п.н.	

Мал. 11.2. Подібні ретровірусам елементи в геномі людини. Автономні елементи (ретротранспозони) нагадують провіруси ретровірусів. LTR – довгі кінцеві повтори.

Є цілком вірогідним, що ретровіруси пішли від ретротранспозонів. Проте не менш вірогідним є те, що принаймні деякі ретротранспозони є нащадками ретровірусних провірусів,

які інтегрувалися в геноми статевих клітин хазяїв. Тут ситуація до деякої міри нагадує ситуацію з яйцем і куркою.

Ретротранспозони називають автономними елементами, оскільки вони мають ген *pol*, який кодує зворотну транскриптазу і завдяки якому вони здатні реплікуватися. Проте геном людини також містить багато неавтономних елементів, які фланковані довгими повторами, але мають послідовність тільки гена *gag*. Деякі з цих елементів можуть бути або залишками ретротранспозонів, або залишками ретровірусних провірусів.

Зрештою, геном людини містить близько 8 відсотків послідовностей, які називають ендегенними ретровірусами.

Інші віруси, що використовують стратегію зворотної транскрипції, такі як гепаднавіруси, можуть мати походження, аналогічне ретровірусам.

Нарешті, можливими попередниками віроїдів можуть бути інтрони, ділянки ДНК, яка вирізується з мРНК в результаті сплайсингу, що не кодує жодних білків.

11.1.3. Внутрішньоклітинні мікроорганізми

Як відомо, мітохондрії і хлоропласти еукаріот мають походження від прокаріотичних клітин, які пристосувалися до нового стилю життя усередині клітини-хазяїна. Передбачається, що предки цих органел пристосувалися до паразитичного або взаємовигідного способу внутрішньоклітинного існування, і з часом усе більш ставали залежними від своїх хазяїв, втративши здатність виконувати багато функцій і втративши гени, які кодували ці функції.

Можливо, подібний еволюційний процес продовжився далі, призвівши до ще більшої дегенерації мікроорганізму і втрати таких функцій, як здатність до синтезу білку, і зрештою цей мікроорганізм міг перестати бути клітиною або органелою, а став вірусом.

Вірусами, які могли з'явитися таким шляхом, є мімівіруси і мегавіруси, які мають великий геном, що кодує багато білків, включаючи ферменти для синтезу полісахаридів і білки, що беруть участь в трансляції. Геноми цих вірусів також кодує шість тРНК.

Досить довгий час вважали, що така глибока дегенерація мікроорганізмів, яка могла б привести до повної втрати клітинної будови, неможлива. Проте відкриття мімі- і мегавірусів вдихнуло життя в цю гіпотезу.

11.1.4. Звідкіля все ж таки віруси трапилися

Поки відповіді на це питання немає. Значна різноманітність структур віріонів вірусів, типів геномів вірусів і стратегій їх реплікації вказує, що різні віруси мають різне походження. Наприклад, невеликі віруси з простою структурою могли походити від молекулярних попередників, тоді як дуже складні віруси, типу мімівірусів і мегавірусів, можуть походити від попередників, що мали клітинну будову.

Проте є одна особливість вірусів, яка є універсальною – це ікосаедрична симетрія. Віруси з ікосаедричною симетрією мають різноманітні варіанти генома і вражають самих різних хазяїв. Проте ця спільність є вірогідним проявом конвергенції – ікосаедрична форма, разом із спіральною, з'явилася у вірусів, що мають різне походження, як економна в сенсі генетичної інформації і стабільна структура.

Слід мати на увазі, що, якого б походження віруси не мали, немає ніяких причин вважати, що їх утворення припинилося. Є цілком вірогідним, що сьогодні нові віруси продовжують виникати з молекулярних і клітинних попередників.

11.2. Еволюція вірусів

Концепція Чарльза Дарвіна надрепродукції і виживання найбільш пристосованих може

бути застосована не лише до живих організмів, але і до вірусів. Аналогічно до живих організмів, віруси мають гени, які прагнуть себе увічнити. Експресія комбінації генів, що становлять геном вірусу, робить можливою реплікацію вірусів. Зміни в окремих генах і їх комбінаціях породжують нові генотипи, більшість з яких менш успішні, ніж батьківські генотипи, і не виживають. Проте в окремих випадках нові генотипи випадково виявляються успішнішими у порівнянні з батьківськими генотипами, і можуть навіть витіснити батьківські генотипи. Іноді нові генотипи дозволяють вірусу заражати нового хазяїна.

Еволюцію живих організмів ми можемо вивчати по викопних залишках. На жаль, «викопні залишки вірусів» не зберігаються. До теперішнього часу вдалося вивчити геноми тільки двох РНК-вмісних вірусів – вірусу грипу А, який викликав пандемію в 1918-19 рр. і вірусу мозаїки томатів. Цей вірус є дуже стійким і його можна виявити в атмосфері. У недавній час РНК 15 штамів цього вірусу було виявлено в льодовиках Арктики, що мають вік від 500 до 140000 років.

11.2.1. Механізми еволюції вірусів

У багатьох стосунках механізми еволюції вірусів є аналогічними механізмам, які визначають еволюцію живих організмів. Ці механізми включають генерацію нових варіантів генома, які піддаються дії природного добору. Значна більшість нових варіантів не виживають, проте деякі можуть забезпечити селективну перевагу в конкретній ніші. У вірусів такою нішею може бути новий вид хазяїна або присутність в організмі хазяїна антивірусних ліків. У такій ніші новий варіант вірусу може успішно реплікуватися як новий штам вірусу. Нові варіанти геномів вірусів можуть виникати в результаті мутацій, пересортовування генів або придбання генів клітини.

11.2.1.1. Мутації

При копіюванні геномів вірусів полімеразою відбуваються деякі помилки. Якщо ці помилки відбуваються в послідовності, що кодує білок, і якщо помилка призводить до заміни амінокислоти у білці, то помилка призводить до мутації. Природний добір зберігає ті мутації, які забезпечують вірусу кращу пристосованість.

Є багато видів тиску природного добору на віруси. Один з таких видів включає імунну відповідь хазяїна; наприклад, новий варіант антигена вірусу тварини, з якою імунна система хазяїна раніше не зустрічалася, матиме перевагу при порівнянні з типом антигена, проти якого у хазяїна є набута стійкість. Таким чином, є сильний тиск добору на вірусні білки, які є мішенями імунної відповіді хазяїна, наприклад на білок gp120 ВІЛ-1. Такі білки вірусу часто є найменш консервативними, найбільш варіабельною є ділянка білку, що є мішенню для антитіла (епітоп). У еволюційного процесу, проте, є обмеження. Білки прикріплення вірусу повинні зберігати конфігурацію, яка дозволяє їм зв'язуватися з рецептором, а ферменти, типу зворотної транскриптази, повинні зберігати свої каталітичні властивості. Для деяких вірусів є додаткові обмеження. Наприклад, такі віруси як вірус жовтої карликовості картоплі, які повинні реплікуватися як в рослині-хазяїнові, так і в комасі-хазяїнові, можуть зазнавати тільки такі мутації, які підвищують їх здатність до реплікації в одному хазяїнові і як мінімум не знижують їх здатність реплікуватися в іншому хазяїнові.

Під час реплікації ДНК-геномів вірусів кількість помилок набагато менша, ніж при реплікації РНК-геномів. Це пов'язано з тим, що ДНК-залежна ДНК-полімераза має механізм виправлення помилок спаровування компліментарних основ, тоді як РНК-полімераза і зворотна транскриптаза такого механізму не мають. Внаслідок цього ДНК-вмісні віруси еволюціонують набагато повільніше, ніж РНК-вмісні віруси.

Велике число помилок при реплікації РНК і зворотній транскрипції означає, що РНК-

вмісні віруси не мають якоїсь фіксованої послідовності основ в геномі. Замість цього, вірусні геноми представлені великою кількістю варіантів; для опису групи варіантів, які в сукупності представляють геном РНК-вмісного вірусу, запропонований термін «квазівид». У багатьох варіантів спостерігається тільки швидкоплинне існування, тоді як найкраще пристосовані до конкретної ніші починають в цій ніші домінувати.

Першим кроком в реплікації геномів ВІЛ є зворотна транскрипція, при якій відбувається приблизно одна помилка на 10^4 доданих нуклеотидів. Оскільки геном ВІЛ містить близько 10^4 основ, це означає, що в середньому відбувається одна помилка при зворотній транскрипції одного генома. Є докази, що віруси імунodefіциту людини перейшли на людей з шимпанзе і мавп родини церкопитекових. Після переходу на новий вид, віруси швидко еволюціонували на багато субтипів і суб-субтипів.

Швидку еволюцію ВІЛ можна спостерігати в тілі зараженої людини, в якій щодня продукується від 10^{10} до 10^{12} нових віріонів. Таким чином, відбувається постійне створення величезної кількості нових генетичних варіантів вірусу. Завдяки цьому, вірус швидко еволюціонує у відповідь на тиск добору, наприклад на присутність антивірусних ліків.

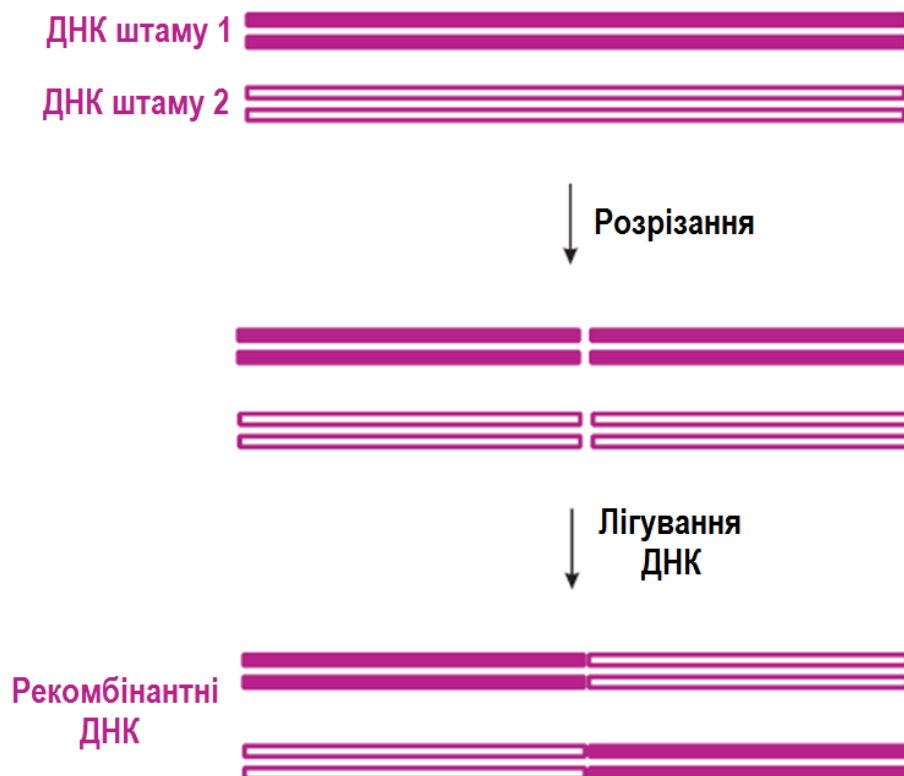
Висока різноманітність також виявлена в геномах інших РНК-вірусів, таких як вірус гепатиту С, у якого ізоляти, виділені у одного пацієнта, мають до п'яти відсотків відмінностей в послідовності нуклеотидів.

Здатність до швидкої еволюції РНК-вірусів створює практичні проблеми в розвитку і підтримці деяких програм по вакцинації. Так, при вакцинації ослабленим вірусом поліомієліту вакцина, представлена одним або більше штамами, вводиться в кишковик, і інфекція в нормі залишається в тілі 1–2 місяці. Проте у деяких вакцинованих людей з імунodefіцитом інфекція залишається набагато довше, і впродовж цього часу вірус завжди еволюціонує. Оскільки між штамами вірусу поліомієліту, вірулентними для нервових клітин, і штамами вакцини є відмінність тільки в декількох нуклеотидах, реверсія до нейровірулентного типу є загальним явищем, і у таких людей може розвинути паралітичний поліомієліт; також вони стають джерелом інфекції вірусу паралітичного поліомієліту для оточення.

Вірус гепатиту В є ДНК-вмісним вірусом, проте оскільки реплікація його генома включає зворотну транскрипцію, частота помилок при реплікації є такою ж високою, як і у РНК-вмісних вірусів. Хоча геном цього вірусу складний і багато мутацій не дозволяють вірусу реплікуватися, варіабельність генома цього вірусу набагато вища, ніж у ДНК-вмісних вірусів, геном яких реплікується тільки з використанням ДНК-залежної ДНК-полімерази.

11.2.1.2. Рекомбінації

Рекомбінація є процесом, результатом якого є утворення нового генома, що має походження від двох батьківських геномів. У вірусів рекомбінація може відбуватися, коли клітина заражена двома спорідненими вірусами. Рекомбінація може відбуватися у ДНК- і у РНК-вмісних вірусів. При рекомбінації ДНК-вмісних вірусів відбувається розрізання батьківської ДНК з подальшим зшиванням рекомбінантів (мал. 11.3).



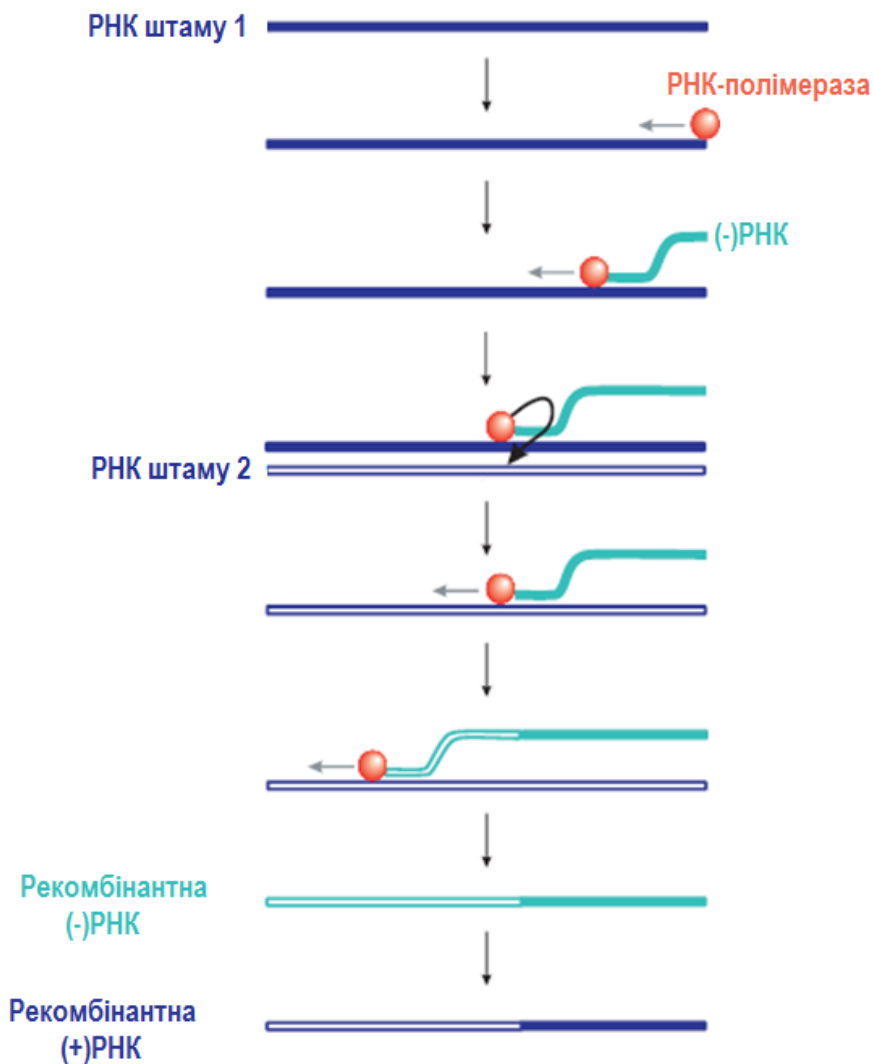
Мал. 11.3. Рекомбінація між ДНК двох штамів вірусу.

Геноми РНК-вмісних вірусів можуть зазнавати рекомбінацію аналогічним чином.

Для вірусів, що містять одноланцюгову РНК, вважають, що рекомбінація може відбуватися за допомогою механізму перемикання матриці. При цьому РНК полімераза транскрибує одну молекулу РНК, далі вона переміщається на іншу молекулу РНК і продовжує синтез з використанням нової матриці (мал. 11.4).

Рекомбінація також є звичайною подією у ретровірусів і гепаднавірусів (параретровірусів). Ймовірно вона відбувається в процесі зворотної транскрипції за допомогою механізму перемикання матриці. У ретровірусів матриці РНК знаходяться у віріоні, і РНК різних штамів можуть опинитися в одному віріоні при спільному зараженні клітини двома штамми вірусу і подальшій зборці віріонів. У параретровірусів матриці РНК різних штамів знаходяться в цитоплазмі клітини.

Рекомбінації у вірусів постійно відбуваються в природі; їх також індукують в лабораторії наприклад для отримання штамів вірусних векторів, що несуть потрібні гени.



Мал. 11.4. Рекомбінація одноланцюгової геномної РНК вірусів за допомогою механізму перемикання матриці.

11.2.1.3. Пересортовування генів

Пересортовування генів є видом рекомбінації, який відбувається у вірусів з сегментованими геномами. Якщо клітина виявиться зараженою двома штамами такого вірусу, то віріони потомства можуть містити суміш сегментом геномів двох батьківських штамів. Такі віріони називають реасортантами.

Реасортанти особливо притаманні вірусу грипу А, геном якого складається з 8 сегментів (–)РНК. Один з сегментів кодує гемаглютинін оболонки вірусу (Н), ще один сегмент кодує нейрамінідазу N. Пересортовування забезпечує появу штамів вірусів з новими комбінаціями варіантів Н і N. Впродовж 20 сторіччя у світі сталися три великі пандемії, викликані реасортантами вірусу грипу А:

Рік	Реасортант вірусу грипу А	Батьківські віруси
1918	H1N1	Невідомі
1957	H2N2	H1N1 людини, H2N2 птиць
1968	H3N2	H2N3 людини, H3 птиць

Найбільш спустошливою була пандемія 1918–19 років, коли кількість людей, убитих вірусом, виявилася більшою за кількість загиблих на Першій світовій війні. З використанням легеневи́х тканин померлих, фіксованих у формаліні і уміщених в парафін, а також занурених у вічну мерзлоту на Алясці, було встановлено, що вірус, який викликав пандемію 1918 року, належав до типу H1N1. Проте його геном відрізняється від генома будь-якого вірусу

грипу, відомого сьогодні, і походження цього вірусу залишається невідомим. Невідомою також залишається причина, з якої зараження людей цим вірусом призвело до великої летальності серед хворих.

Походження вірусів, відповідальних за дві пізніші пандемії грипу, було встановлене. У кожному випадку віруси були реасортантами між вірусами грипу людей і птахів.

11.2.1.4. Придбання генів клітини

Відкриття схожості між деякими білками вірусів і білками клітини привело до висновку, що деякі віруси захопили гени клітини. Геноми низки ретровірусів містять онкогени, які вони ймовірно придбали у клітин своїх хазяїв, які мають схожі гени (протоонкогени). Прикладом є ген *src* вірусу саркоми Рауса, дуже схожий з геном *c-src*, який мають клітини усіх хребетних тварин.

Ретровіруси можуть придбати онкогени за допомогою рекомбінації між провірусною ДНК і ДНК хазяїна, або при синтезі РНК вірусу, якщо транскрипція не закінчується на провірусній ДНК і триває на протоонкогені, що знаходиться в хромосомі поряд з провірусною ДНК.

Білки, подібні до білків клітини-хазяїна, мають не лише ретровіруси. Деякі білки вірусів модулюють імунну систему хазяїна, часто імітуючи білки клітини. Наприклад, деякі герпесвіруси людини кодують білки, подібні до цитокінів і білків головного комплексу гістосумісності. Деякі великі ДНК-вмісні віруси кодують білки, подібні до інтерлейкіну-10, і деякі з цих білків пригнічують клітинну імунну відповідь. Чи мають гени вірусів, які кодують такі білки, походження від генів клітини, і якщо так, яким чином віруси можуть їх придбати?

Одним з можливих механізмів є рекомбінація. Проте для її здійснення ДНК вірусу, що реплікується, і ДНК клітини повинні опинитися у безпосередній близькості. Це цілком можливо для ДНК-вмісних вірусів, реплікація яких здійснюється в ядрі (наприклад, у герпесвірусів). Проте є ДНК-вмісні віруси, геном яких в ядро не проникає, наприклад у вірусу віспи. У таких вірусів геноми не опиняються у безпосередній близькості від ДНК хазяїна.

Ще однією можливістю для вірусу придбати гени клітини є синтез ДНК на клітинних мРНК, з подальшою вставкою цієї ДНК в геном вірусу. Синтез ДНК на РНК-матриці вимагає наявності зворотної транскриптази, тому така можливість може бути реалізована тільки при спільному зараженні клітини вірусом і ретровірусом, або за наявності в геномі хазяїна ДНК (яка, наприклад, має ретровірусне походження), що кодує зворотну транскриптазу.

11.2.2. Поява нових вірусів

Час від часу з'являються нові віруси, і їх походження оточене таємницею. Проте секвенування геномів нових вірусів і деяких відомих вірусів показує, що нові віруси зазвичай є вже існуючими вірусами, що заражають нових хазяїв, в яких відбувається подальша еволюція цих вірусів. У багатьох випадках зараження нового хазяїна є глухим кутом, оскільки не відбувається передачі вірусів новим особинам. Проте іноді вірус адаптується і придбаває здатність передаватися від одного хазяїна іншому. Таким чином, потрапляючи в новий вид хазяїна, вірус повинен придбати ряд нових здібностей, зокрема реплікуватися в новому хазяїнові, уникати імунної відповіді нового хазяїна і передаватися іншим особинам нового хазяїна.

У 1978 році новий парвовірус з'явився у собак і швидко поширився по всьому світу. Послідовність генома цього парвовірусу виявилася більш ніж на 99% ідентичною парвовірусу кішок (вірусу панлейкопенії, або інфекційного гастроентериту). Обидва віруси можуть заражати клітини кішок, але тільки вірус собак може заражати клітини собак. Вважають, що

вірус кішок був предком вірусу собак.

Так само послідовності геномів ВІЛ-1 і ВІЛ-2 дуже подібні послідовності вірусу імунodefіциту мавп, знайденого у шимпанзе і темно-коричневих мангабеїв (примати родини церкопитеків) відповідно. Як вважають, обидва віруси здолали міжвидовий бар'єр при контакті людей з м'ясом і кров'ю мавп.

11.2.3. Коеволюція вірусів і їх хазяїв

Асоціації вірус-хазяїн, які існують впродовж тривалого часу, ймовірно розвиваються у бік таких взаємовідносин, при яких вірус завдає слабку шкоду хазяїнові, або не шкодить взагалі. Прикладами таких вірусів є депендовіруси і деякі реовіруси, які не асоційовані ні з яким захворюванням. Ймовірно, члени цих груп вірусів, які заражають *Homo sapiens*, є супутниками людей з моменту виділення людини в окремий вид.

Коли вірус починає заражати нового хазяїна, він часто стає набагато більше вірулентним для нового хазяїна, ніж був для старого. Прикладами є вірус імунodefіциту шимпанзе і вірус імунodefіциту темно-коричневих мангабеїв, які є авірулентними для своїх хазяїв, але при переході на людину і перетворенні у ВІЛ-1 і ВІЛ-2 вони виявилися летальними для нового хазяїна.

Вірулентний вірус може впливати на еволюцію свого хазяїна, спричиняючи зникнення генів, які обумовлюють сприйнятливість до вірусної інфекції, поки добір сприятиме генам стійкості. ВІЛ-1 нині чинить тиск відбору на користь делеції розміром 35 нуклеотидів в гені CCR5, який підтримує сприйнятливість до зараження.

Хорошим прикладом коеволюції вірусу і хазяїна є взаємовідносини вірусу міксоми і європейського кролика. У природних хазяїв вірусу, видів кроликів з Південної Америки, зараження вірусом викликає розвиток пухлин шкіри, які з часом проходять. В протилежність цьому, коли вірус міксоми заражає особини європейського кролика, він викликає міксоматоз, для якого характерні гострий кон'юнктивіт, здуття на шкірі і втрата апетиту. Захворівання майже завжди виявляється фатальним, і з цієї причини вірус був інтродукований в Австралію в якості агента біологічного контролю дикого кролика. Після декількох років інтродукції були отримані докази еволюції вірусу. З'явилися штами вірусу міксоми з ослабленою вірулентністю, які ймовірно передаються ефективніше. Окрім цього, у кроликів почали спостерігатися випадки стійкості до вірусу. Таким чином, вірус і його новий хазяїн зазнають коеволюцію.

Завершення коеволюції вірусу і його хазяїна, ймовірно, відбувається тоді, коли геном вірусу вбудовується в геном хазяїна. Ймовірно, це сталося, коли принаймні деякі послідовності ендегенних ретровірусів/ретротранспозонів з'явилися в геномах еукаріот.

Геноми прокаріот також містять послідовності, які є результатом інтеграції вірусних геномів в процесі лізогенії. Послідовності фагів (профаги) виявлені у більшості геномів бактерій, які були секвеновані. Деякі з цих профагів здатні до індукції, тобто можуть активуватися, вірус починає реплікацію і клітина хазяїна лізується. Інші профаги є дефектними, і їх реплікацію індукувати не можна. Гени, пов'язані з низкою особливостей бактерій, кодуються послідовностями профагів, наприклад синтез холерного токсину у *Vibrio cholera*.

Додаткове читання до глави 11.

7. Каверин Н.В., Смирнов Ю.А. Межвидовая трансмиссия вирусов гриппа а и проблема пандемий // Вопросы вирусологии.—2003.— Т.48, №3.— С. 4–10.
8. Bamford D.H., Grimes J.M., Stuart D.I. What does structure tell us about virus evolution? // Curr. Opin. Struct. Biol.—2005.— V. 15, №6.—P. 655–663.

9. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions // *Virus Res.*– 2006.–V. 117, №1.–P.5–16.
10. Forterre P., Prangishvili D. The origin of viruses // *Res. Microbiol.*– 2009.–V.160, №7.–P.466–472.
11. Holland J., Domingo E. Origin and evolution of viruses // *Virus Genes.*–1998.– V.16, № 1. P. 13–21.
12. Koonin E.V., Senkevich T.G., Dolja V.V. The ancient Virus World and evolution of cells // *Biol. Direct.*– 2006.–1:29.
13. Nasir A., Kim K.M., Caetano-Anollés G. Viral evolution: Primordial cellular origins and late adaptation to parasitism // *Mob. Genet.Elements.*– 2012.–V.2,№5.–P.247–252.
14. Roossinck M.J. Mechanisms of plant virus evolution // *Annu. Rev. Phytopathol.* –1997.– V.35.–P.191–209.
15. Roossinck M.J. Symbiosis versus competition in plant virus evolution // *Nat. Rev Microbiol.*–2005.– V.3,№12.–P.917–924.
16. Xiong Y., Eickbush T.H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences // *EMBO J.* –1990.–V.9,№10.– P.3353–3362.

Глава 12. Генетика вірусів

12.1. Склад і організація генома вірусів

Склад і структура генома вірусів варіює сильніше, ніж в цілих царствах прокаріот, рослин, тварин або грибів. Генетичний матеріал вірусів може являти собою РНК або ДНК, які бувають одно- і дволанцюговими, лінійними, кільцевими або сегментованими.

Якого б складу геном не мав, повинна бути дотриманою одна умова. Оскільки віруси є облигатними внутрішньоклітинними інфекційними агентами, які можуть реплікуватися тільки усередині відповідної клітини хазяїна, геном вірусу повинен містити інформацію, закодовану у формі, яка має бути розпізнана і декодована зараженою вірусом клітиною. Генетичний код, використовуваний вірусами, повинен розпізнаватися організмом хазяїна. Так само, сигнали, які контролюють експресію генів і реплікацію вірусного генома, повинні бути зрозумілими хазяїну.

Розмір вірусного генома варіює від 3,5 тисяч або менше нуклеотидів до 1,2 млн пар нуклеотидів у мімовірусів, що перевершує по розмірах геном мікоплазм. Відповідно, число генів у вірусному геномі варіює від 3–4 у найбільш простих вірусів до більше півтора сотень у складно влаштованих вірусів.

Геном вірусів по суті є гаплоїдним. У випадку сегментованого генома, кожен сегмент у вірусній частці представлений зазвичай єдиною копією.

Як і у випадку ДНК еукаріот, геном ДНК-вірусів часто має складну структуру з чергуванням кодуєчих і некодуєчих послідовностей. У вірусів широко представлений механізм сплайсингу РНК, і зокрема альтернативного сплайсингу, коли з одного транскрипту пре-мРНК утворюються різні матричні РНК.

До складу геномів вірусів входять усі необхідні регуляторні ділянки, включаючи промотори і енхансери, а також ділянки активації реплікації ДНК.

12.2. Способи збільшення кодуєчої місткості вірусного генома

Вірусам доводиться пакувати свій генетичний матеріал в обмежений об'єм. Тому фізичний розмір геномних нуклеїнових кислот має бути невеликим. З іншого боку, вірусам необхідно кодувати в геномі свої власні білки, без яких їх репродукція виявляється неможливою. Таким чином, вірусам необхідно розв'язати проблему кодування максимальної кількості білків в молекулі нуклеїнової кислоти мінімального розміру. Інакше кажучи, вірусам необхідно максимально збільшити кодуєчу місткість генома.

У багатьох вірусів молекулярна маса білків, що синтезуються, перевершує теоретично розраховану для нуклеїнової кислоти генома цього вірусу. Цей феномен пояснюється наявністю в геномах вірусів особливостей, що дозволяють зберігати максимум генетичний інформації при мінімальному розмірі генетичного матеріалу. Способами збільшення генетичної інформації є перекривання генів; зсув рамки зчитування при трансляції; альтернативний сплайсинг мРНК; використання поліцистронних мРНК; використання в мРНК декількох ініціюючих кодонів; синтез поліпротеїнів, які потім розрізаються на декілька функціональних білків специфічними протеазами.

12.3. Основні процеси, які контролюють спадковість і мінливість у вірусів

12.3.1. Модифікації

Модифікаціями називають не успадковані фенотипічні зміни у вірусів, обумовлені клітиною-хазяїном. Наприклад, у вірусів, що брунькуються через плазмалему, до складу оболонки входять ліпіди, гліколіпіди і глікопротеїни хазяїна і глікопротеїни вірусу. Так, у вірусу ньюкаслської хвороби птахів, вирощеного в курячих ембріонах, до складу гліколіпідів оболонки входять антигени групи крові, проте після одного пасажу через курячий ембріон вони втрачаються.

12.3.2. Мутації

У основі мінливості вірусів лежать мутації, тобто зміна складу і послідовності нуклеотидів вірусного генома. Мутації відбуваються в усіх вірусів, незалежно від того, чи представлений їх геном РНК або ДНК. Подальша доля вірусів з геномом, що мутував, залежить від природного добору.

Мутації можуть мати різні наслідки. Вони призводять до зміни вірулентності вірусу, або його чутливості до антивірусних агентів, або до зміни його стійкості в довкіллі, або змінюють інші особливості.

В деяких випадках мутації є летальними, оскільки внаслідок мутації порушується синтез або функція абсолютно необхідного для реплікації вірусного білку, наприклад реплікази. У інших випадках мутації можуть бути умовно летальними, оскільки вірусний білок зберігає свою функцію в одних умовах, але втрачає в інших. Типовим прикладом таких мутацій є температурно-чутливі мутації (temperature sensitive, ts), коли вірус втрачає здатність до реплікації при підвищених температурах (39-42° C), але зберігає цю здатність при звичайних температурах культивування (36-37° C).

За своїм механізмом мутації можуть бути різними. У одних випадках може відбуватися делеція, тобто випадання одного або декількох нуклеотидів. У інших випадках може відбуватися інсерція, тобто вставка одного або декількох нуклеотидів. Також може відбуватися заміна одного нуклеотиду на інший.

Мутації можуть бути прямими і зворотними. Прямі мутації змінюють фенотип, а зворотні – реверсії – його відновлюють. Можливі істинні реверсії, коли зворотна мутація відбувається в тому ж місці генома, де сталася пряма мутація, і псевдореверсія, якщо мутація відбувається в іншій ділянці гена (інтрагенна супресія), що мутував, або в іншому гені (екстрагенна супресія). При прямій реверсії білок, що раніше мутував, повністю відновлюють свою структуру. При псевдореверсії білок, що мутував, відновлює свою функцію або за допомогою іншого білку, що мутував, або за допомогою мутації у іншому місці того ж білку, після якої блок, наприклад, може відновити свою правильну форму. Реверсія не є рідкісною подією. З цієї причини при отриманні мутантів із заданими властивостями, наприклад штамів вірусів з ослабленою хвороботворністю для отримання вакцин, доводиться зважати на можливість їх реверсії до дикого типу.

12.4. Генетичні і негенетичні взаємодії між вірусами

Як у природних, так і в експериментальних умовах одна клітина може бути заражена не одним, а декількома вірусами. При такій змішаній інфекції можуть мати місце різні форми взаємодії як між вірусними геномами, так і між продуктами генів вірусів. При взаємодії геномів можуть спостерігатися такі форми генетичних взаємодій, як множинна реактивація,

рекомбінація, пересортовування генів, крос-реактивація, гетерозиготність. При взаємодії продуктів генів можуть мати місце негенетичні взаємодії: комплементация, інтерференція, фенотипічне змішування і деякі інші.

12.4.1. Генетичні взаємодії між вірусами

12.4.1.1. Множинна реактивація

При зараженні клітини в неї можуть проникнути декілька вірусних часток з пошкодженими геномами. Кожен з цих віріонів не зміг би реплікуватися, проте цілком можлива ситуація, коли відсутній продукт гена, пошкодженого у одного віріона, доповнює відповідний неушкоджений ген іншого віріона. При цьому в зараженій клітині вірус успішно реплікується, утворюючи повноцінні неушкоджені віріони.

Це явище спочатку було виявлене у бактеріофагів і дістало назву множинної реактивації. У його основі лежить кооперативний процес, при якому віріони з пошкодженими геномами доповнюють один одного шляхом генетичної рекомбінації, внаслідок чого виникає неушкоджений вірусний геном. Ефективність множинної реактивації залежить від багатьох причин: ступеня ушкодження генома віріонів, кількості геномів та ін., що проникли в клітину.

12.4.1.2. Рекомбінація

Генетичною рекомбінацією називають обмін генетичним матеріалом між батьківськими вірусами. Рекомбінація можлива у вигляді обміну цілими геномами (міжгенна рекомбінація) або ділянками одного і того ж гена (внутрішньогенна рекомбінація).

12.4.1.3. Пересортовування генів

Пересортовування генів є варіантом рекомбінації між вірусами, що мають сегментований геном. Форми вірусів, що утворюються при пересортовуванні генів, називають реасортантами. Наприклад, з 1950-х років отримують реасортанти вірусу грипу, зокрема для отримання вакцини. Чи можуть бути реасортанти причиною пандемій, залишається дискусійним питанням.

12.4.1.4. Перехресна реактивація

Перехресна реактивація, або крос-реактивація, відбувається у випадку зараження клітини двома варіантами вірусів, коли один варіант має пошкоджений геном, а іншої немає. При змішаній інфекції між вірусами можлива рекомбінація неушкоджених ділянок генома вірусу з пошкодженим геномом і повноцінного вірусу. В результаті з'являються штами вірусів з властивостями обох батьків.

12.4.1.5. Гетерозиготність

При спільному культивуванні вірусів може відбуватися формування віріонів, що містять у своєму складі два різні геноми або принаймні частину другого генома. Це явище назване гетерозиготністю. Уперше воно було знайдено у бактеріофагів. Проте така подія часто спостерігається і у вірусів тварин; більше того, у вірусів тварин, які розмножуються брунькуванням, в одній оболонці часто виявляються декілька нуклеокапсидів. Такий вірус можна назвати поліплоїдним, а якщо геноми нуклеокапсидів походять від різних батьків, то це можна назвати гетероплоїдією. Слід зазначити, що можливість гетероплоїдів може значно утрудняє генетичний аналіз вірусів, оскільки її результат практично неможливо відрізнити від рекомбінації.

12.4.2. Негенетичні взаємодії між вірусами

12.4.2.1. Комплементация

Комплементация, або доповнення, є видом негенетичної взаємодії між вірусами, при якій під час спільного зараження клітини двома вірусами стимулюється репродукція одного або

обох партнерів. Генотипи вірусів при цьому не змінюються, тобто не відбувається ніяких рекомбінацій. Суть комплементарності полягає в тому, що один вірус забезпечує партнера відсутніми компонентами, зазвичай структурними або неструктурними білками.

Комплементарність може бути двосторонньою і односторонньою. При двосторонній комплементарності кожен з партнерів не здатний до самостійної реплікації, і тільки разом вони успішно реплікуються. При односторонній комплементарності один з партнерів забезпечує іншого продуктом, якого нестаче. Комплементарність спостерігається як між спорідненими вірусами, так і між неспорідненими вірусами. Прикладом односторонньої комплементарності за участю неспоріднених вірусів є реплікація вірусів-сателітів у присутності вірусу-помічника.

12.4.2.2. Фенотипічне змішування

При спільному культивуванні двох вірусів може спостерігатися феномен фенотипічного змішування, коли потомство набуває фенотипічних ознак обох батьків, хоча генотип при цьому не змінюється. Зазвичай фенотипічне змішування може відбуватися між вірусами, що мають деякі загальні риси, наприклад структуру капсиду, або які розмножуються брунькуванням на одній і тій же мембрані хазяїна. При цьому, наприклад, геном одного вірусу може виявитися поміщений в капсид, що частково або повністю складається з білків іншого вірусу.

12.4.2.3. Інтерференція вірусів

Інтерференція вірусів – це тип негенетичної взаємодії між вірусами, при якій спостерігається пригнічення репродукції одного вірусу іншим в клітинах, заражених двома вірусами. Проявляється інтерференція на різних стадіях вірусної інфекції і може бути обумовлена конкуренцією за клітинні рецептори, за ділянки реплікації нуклеїнової кислоти і трансляції, виснаженням метаболітів в клітині, індукцією інтерферону і іншими причинами.

Додаткове читання до глави 12.

1. Пейлиз П., Кінгсбери Д.У. Генетика вірусів гриппа. – М.: Медицина, 1986. – 167 с.

Глава 13. Основні методи досліджень і ідентифікації вірусів

13.1. Культивування вірусів

Вірусологам потрібні методи культивування їх об'єктів досліджень. У переважній більшості випадків це означає, що віруси необхідно забезпечити відповідними клітинами, які вони можуть заразити і в яких може проходити їх реплікація. Бактеріофаги можна забезпечити клітинами бактерійної культури, віруси рослин можна культивувати в спеціально вирощуваних рослинах або в рослинних протопластах. Ймовірно, найскладніше культивувати віруси тварин.

13.1.1. Культивування вірусів в лабораторних тваринах

Аж до середини 30-х років 20 сторіччя експериментальні зараження тварин або рослин і ультрафільтрація були головними методами ідентифікації вірусів. Ці методи дозволили виділити багато вірусів домашніх тварин, деякі віруси комах і рослин. Проте стандартні лабораторні тварини – миші, щури, морські свинки, кролики – несприйнятливі до більшості вірусних інфекцій людини.

До середини 30-х років за допомогою лабораторних тварин були відкриті збудники грипу і герпесу. До вірусу грипу дуже чутливими виявилися тхори. Використання мавп як лабораторних тварин дозволило відкрити віруси віспи, поліомієліту, жовтої лихоманки, Денге.

Вибір експериментальних тварин визначається метою роботи і видовою чутливістю до вірусу, що вивчається. Лабораторних тварин заражають різними способами залежно від тропізму вірусу до певних тканин. Так, наприклад, для культивування нейротропних вірусів зараження роблять переважно в мозок (віруси сказу, кліщового енцефаліту та ін.), культивування респіраторних вірусів здійснюється при інтраназальному інфікуванні тварин (віруси грипу), дерматотропних (вірус віспи) – шляхом наскірного і внутрішньошкірного зараження. При роботі з тваринами найчастіше використовуються наскірне, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне і внутрішньомозкове зараження.

При первинному зараженні тварини можуть не захворіти, тому через 5–7 діб зовні здорових тварин вбивають, а з їх органів готують суспензії, якими заражають наступні партії тварин. Ці послідовні зараження називаються «пасажами».

Індикацію, тобто виявлення факту розмноження вірусу, встановлюють на підставі розвитку типових ознак захворювання, патоморфологічних змін органів і тканин тварин або іншими способами, наприклад по позитивній реакції гемаглютинації (РГА). РГА заснована на здатності деяких вірусів викликати аглютинацію (склеювання) еритроцитів різних видів тварин, птахів і людини за рахунок поверхневого вірусного білку – гемаглютиніну. Нині використання тваринних для культивування вірусів обмежене.

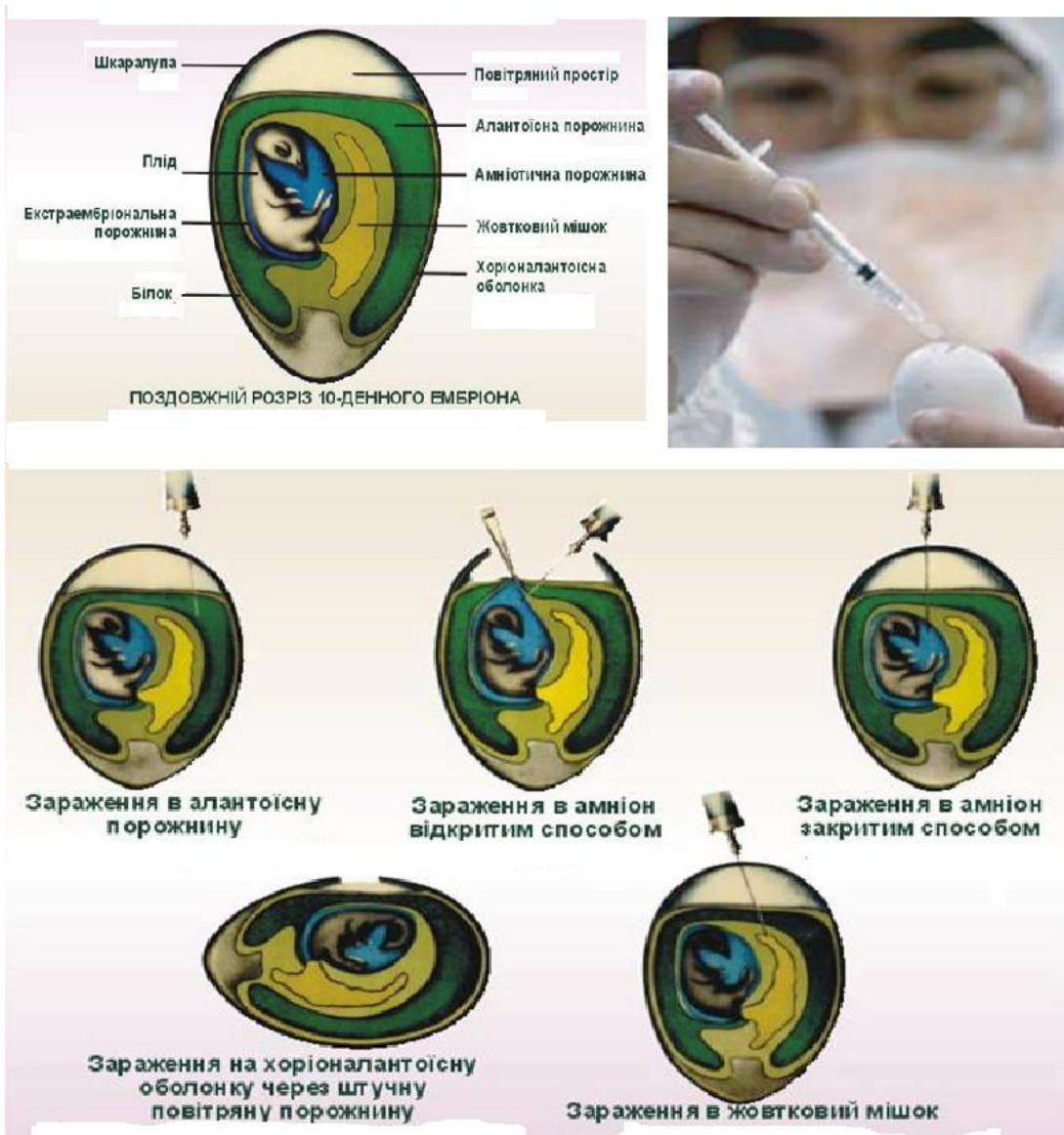
Окрім очевидних проблем, пов'язаних у тому числі з питаннями біоетики, культивування вірусів в тваринах має ще одні недолік. При зараженні експериментальних тварин, чутливих до того або іншого вірусу, цей останній накопичується у внутрішніх органах або нервовій тканині, звідки його важко виділити в чистому вигляді, звільнивши від клітинних білків.

13.1.2. Культивування вірусів в курячих ембріонах

В середині 1930-х років австралійський вірусолог Ф. Барнет (F. Burnet) почав використовувати новий для вірусології експериментальний об'єкт – курячі ембріони (мал. 13.1). Курячі ембріони – практично ідеальні моделі для культивування вірусів. Замкнута порожнина ем-

бріона перешкоджає проникненню мікроорганізмів ззовні, а також розвитку спонтанних вірусних інфекцій. Ембріони застосовують для первинного виділення вірусів з патологічного матеріалу; для пасивування і збереження їх, а також для отримання необхідних кількостей вірусу.

Для зараження вірусами зазвичай використовують 10-12-денні курячі зародки, у яких в цей час добре розвинені оболонки – хоріон-алантоїсна і амніотична. При зараженні їх вірусами може розвинути вірусна інфекція. При цьому розмноження вірусу відбувається впродовж 3–4 діб, коли імунітет ще не устигає розвинути.



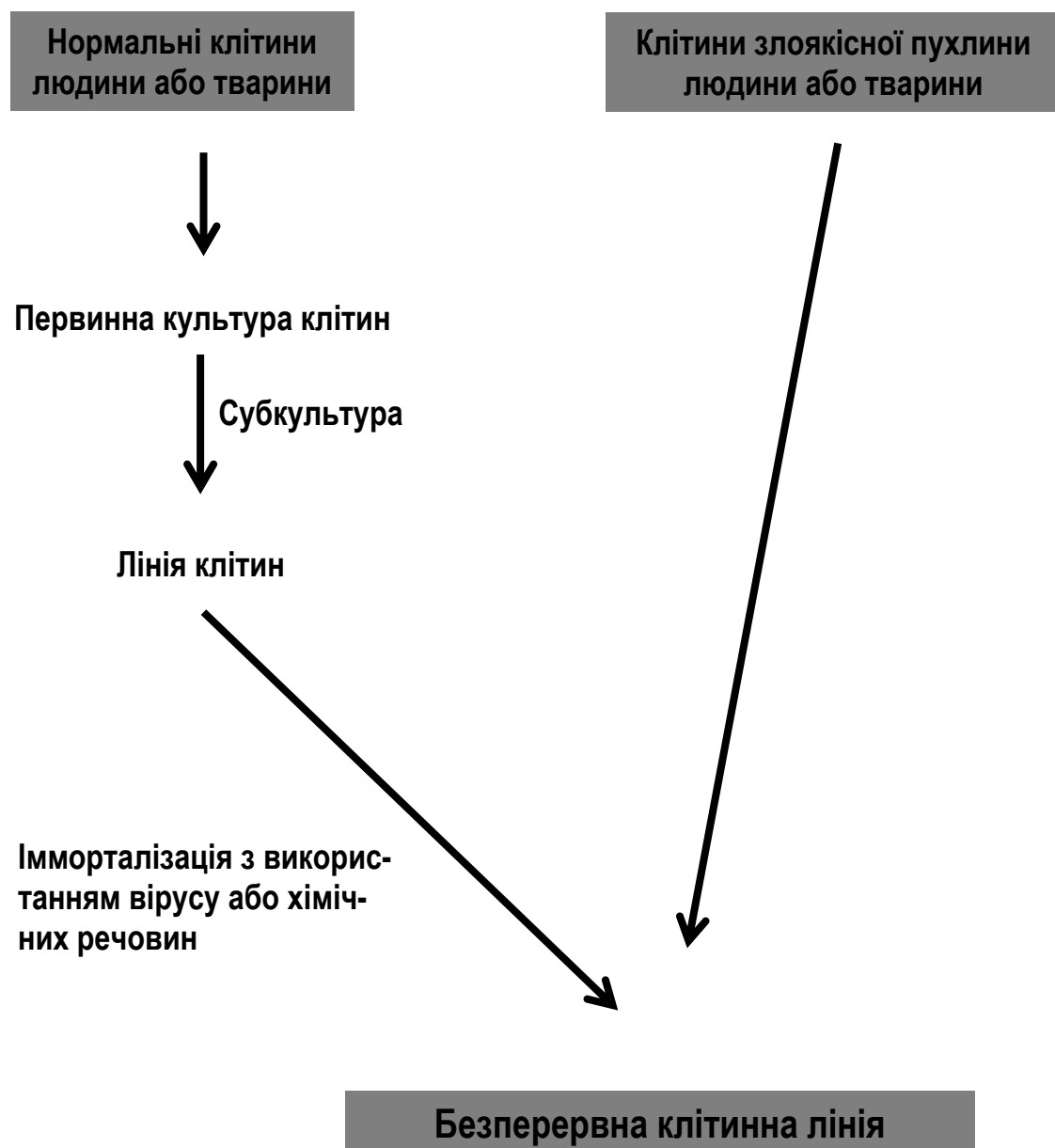
Мал. 13.1. Способи зараження курячих ембріонів.

Розмноження вірусу в курячих ембріонах відбувається в різних частинах зародка, що пов'язано з особливостями тропізму вірусу. Розмножуючись в зародкових оболонках, вірус виділяється в алантоїсну і амніотичну рідину, де накопичується у величезних кількостях (до декількох мільярдів віріонів в 1 мл). Надалі вірус може бути осаджений в центрифугі і додатково очищений різними методами.

Методику вирощування вірусу в курячому ембріоні широко використовують при промисловому культивуванні. Окрім курячих ембріонів, в деяких випадках використовуються ембріони інших птахів – качок, перепелиць.

13.1.3. Культивування вірусів в культурі тканин і клітин

Методи культивування тканин і клітин тварин були розроблені до середини минулого століття. Нині більшість клітин для безперервних культур мають походження від людей або інших видів тварин. Безперервна культура клітин складається з клітин, які стали безсмертними або в тілі, або в лабораторії (мал. 13.2); такі клітини можна культивувати необмежено. Широко поширеною є клітинна лінія HeLa. Вона була отримана 8 лютого 1951 року з ракової пухлини шийки матки пацієнтки на ім'я Генрієта Лакс (англ. Henrietta Lacks), що померла від цього захворювання 4 жовтня того ж року. Іноді важко знайти лінію клітин, в якій вірус може реплікуватися. Так, довго не вдавалося підібрати відповідну клітинну культуру для вірусу гепатиту С, проте зрештою була знайдена лінія клітин гепатоми людини, яка підтримувала реплікацію вірусу.



Мал. 13.2. Походження безперервних ліній клітин.

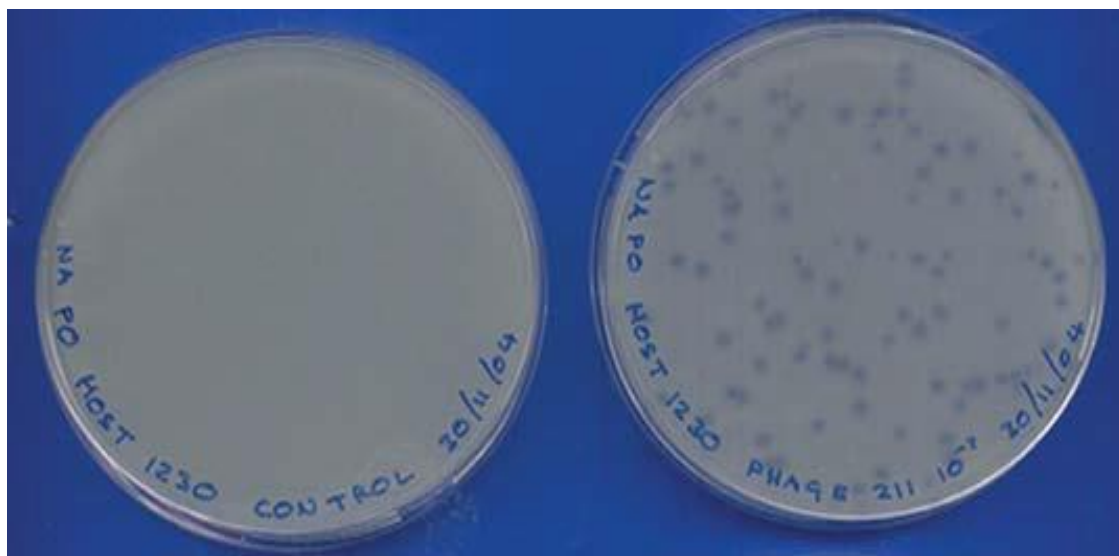
Клітини культивують в середовищах, в які додають поживні елементи. Більшість середовищ містять сироватку крові тварин, в якій є речовини, які підтримують ріст багатьох

ліній клітин. Велике значення мають також осмотичний тиск і рН середовища. Більшість клітин вирощують в пластикових або скляних судинах у вигляді єдиного шару клітин, що називається моношаром. Альтернативно клітини можна культивувати у вигляді суспензії в струшуваному рідкому середовищі. Багато типів клітин вимагають відносно високої концентрації двоокису вуглецю, який забезпечують в спеціальних інкубаторах.

13.2. Виділення вірусів

Багато вірусів виділяють з використанням їх здатності викликати утворення дискретних видимих зон, так званих бляшок, в шарі клітин хазяїна. Якщо зімкнутий шар клітин інокулювати вірусом в концентрації, при якій заражається тільки невелика частина клітин хазяїна, бляшки можуть формуватися як область клітин, убитих або пошкоджених вірусною інфекцією. Кожна бляшка формується, коли інфекція радіально поширюється від зараженої клітини в навколишні клітини. Бляшки формують багато вірусів тварин, коли моношар клітин заливається агарозним гелем для збереження вірусного потомства в дискретній зоні. Бляшки також формують бактеріофаги на газоні культури бактерій (мал. 13.3).

Передбачається, що бляшка є результатом зараження клітини єдиним віріоном. Якщо це так, то усі віруси, що знаходяться у бляшці, є клоном, тобто мають бути генетично ідентичними. Такий клон називають ізолятом, і якщо він відрізняється від усіх інших ізолятів, його називають штамом. Це аналогічно походженню штамів бактерій з колонії на поверхні агару.



Мал. 13.3. Бляшки, викликані бактеріофагом на газоні бактерійної культури. Ліворуч – чиста культура бактерій, праворуч – культура бактерій, інокульована бактеріофагом.

Є вірогідність, що бляшка бере походження від двох або більше віріонів, тому для збільшення вірогідності отримання генетично чистого штаму вірусу, матеріалом однієї бляшки знову заражають моношар клітин, і виділяють вірус з окремої бляшки. Про такий вірус говорять, що він був очищений методом бляшок.

Коли вірус виділяють уперше, він може погано реплікуватися в клітинах в лабораторії, проте після декількох циклів реплікації він може реплікуватися ефективніше. В результаті таких пасажів вірус може стати генетично відмінним від початкового дикого штаму; у такому випадку вірус стає лабораторним штамом.

13.2.1. Центрифугування

Після того, як вірус розмножений, зазвичай необхідно очистити його від залишків клітин

і інших забруднюючих матеріалів, оскільки для досліджень, для приготування вакцин або для інших цілей найчастіше використовують очищені вірусні частки. Звичайним методом очищення є центрифугування; часткове очищення досягається диференціальним центрифугуванням, і найвища міра очищення досягається центрифугуванням в градієнті щільності.

Диференціальне центрифугування включає центрифугування з низькою швидкістю, після якого більшість віріонів залишаються в надосадковій рідині, і високошвидкісне центрифугування, після якого віруси випадають в осад у вигляді гранул (мал. 13.4). На першому етапі центрифугування проводять, наприклад, при 10 000 g 20 хвилин, а на другому етапі – при 100 000 g 2 години. Таким чином отримують препарат частково очищених віріонів.

При центрифугуванні в градієнті щільності, вірусні частки або молекули типу нуклеїнових кислот центрифугують в розчині із зростаючою концентрацією і відповідно щільністю. В якості речовини, що розчиняється, використовують добре розчинні з'єднання; дуже часто використовується сахароза.

Є два типи центрифугування в градієнті щільності: швидкісне зональне і рівноважне зональне центрифугування (мал. 13.5.). При швидкісному зональному центрифугуванні частково очищені віріони наносять на поверхню градієнта; далі частки рухаються крізь градієнт, при цьому швидкість їх руху залежить від коефіцієнта седиментації. Величина цього коефіцієнта обумовлена в основному розміром часток. Однорідні частки, такі як віріони вірусу, рухаються в градієнті у вигляді єдиної смуги, яку надалі можна зібрати. Центрифугування закінчують, коли частки ще не досягають дна пробірки.



Мал. 13.4. Часткове очищення віріонів диференціальним центрифугуванням



Мал. 13.5. Очищення віріонів швидкісним зональним або рівноважним зональним центрифугуванням.

При рівноважному зональному центрифугуванні концентрацію розчину, що створює градієнт, підбирають так, щоб щільність внизу градієнта була гарантовано більше щільності часток, які очищаються. Частки суспендують в градієнті, і потім при центрифугуванні вони переміщуються в ту зону градієнта, в якій щільність розчину така ж, як і у них. Плавучу щільність віріонів в градієнті розчину хлористого цезію використовують як однієї з характеристик вірусних віріонів.

13.3. Дослідження структури клітин і віріонів

Розміри більшості віріонів знаходяться за межами роздільної здатності світлового мікроскопа. Проте, світлова мікроскопія є корисним методом для дослідження заражених вірусом клітин або для визначення флуоресцентних барвників, пов'язаних з молекулами антитіл, що зв'язалися з вірусними антигенами.

Особливо корисною у вірусології може виявитися конфокальна мікроскопія.

Більшість досліджень структури віріонів або заражених вірусом клітин були проведені з використанням електронного мікроскопа. Використання різних методів електронної мікроскопії дозволяє вивчати як внутрішню структуру віріонів, так і їх тривимірну будову. Для отримання тривимірних зображень використовують зокрема кріоелектронну мікроскопію у поєднанні з комп'ютерною томографією.

Тонкі деталі тривимірної будови вірусів, вірусних нуклеїнових кислот і білків також вивчають за допомогою рентгеноструктурної кристалографії. Для цього методу отримують кристали віріонів або молекул, які необхідно вивчити. Далі кристали поміщаються в рентгенівські промені, які зазнають дифракцію завдяки побудові атомів і/або молекул, що повторюється. Аналіз характеру дифракції дозволяє встановити відносні позиції молекул і атомів.

Корисну інформацію стосовно структури вірусів дають також такі методи, як ядерний магнітний резонанс і атомна силова мікроскопія, електрофорез в гелі агарози або поліакриламід.

13.4. Визначення вірусів і їх компонентів

Для визначення вірусів і вірусних компонентів були розроблені численні методи, які використовують зокрема для діагностики вірусних захворювань. Ці методи можна розподілити на чотири категорії:

1. Виявлення віріонів.
2. Визначення інфективності вірусів.
3. Виявлення вірусних антигенів.
4. Виявлення нуклеїнових кислот вірусу.

13.4.1. Виявлення віріонів

Зразки можна негативно забарвити і досліджувати в електронному мікроскопі на присутність віріонів. Обмеженнями такого підходу є висока вартість устаткування і невисока чутливість; мінімально виявлювана концентрація віріонів складає 10^6 /мл. Прикладом використання такого підходу являється аналіз фекалій пацієнта з гастроентеритом на присутність ротавірусних часток.

13.4.2. Визначення інфективності вірусів

Не усі віріони мають здатність реплікуватися в клітинах хазяїна. Ті віріони, які здатні це

робити, називають «інфективними», і термін «інфективність» використовують для позначення здатності вірусів реплікуватися. Віріони можуть бути не інфективними через відсутність частини генома або через пошкодження.

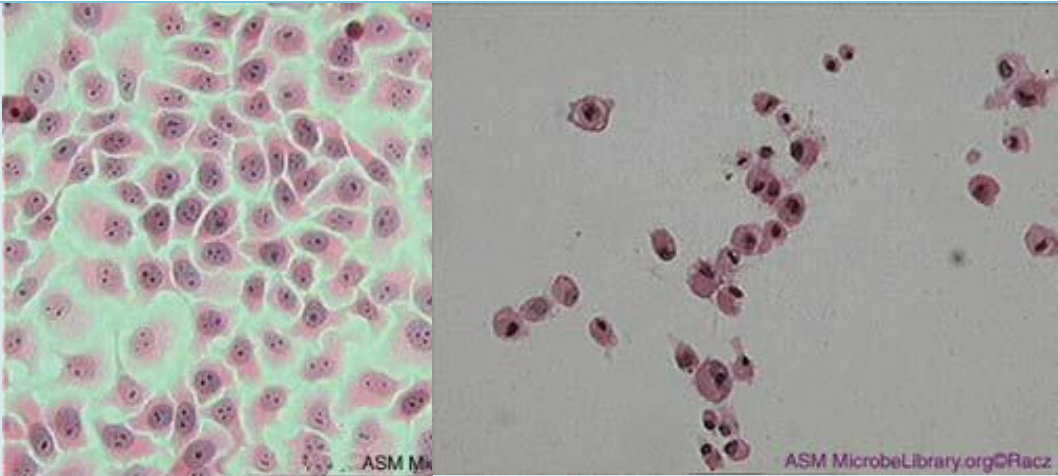
Для встановлення, чи містять зразки інфективні віруси, ними можна інокулювати культуру клітин або організм хазяїна, для якого відомо, що він підтримує реплікацію вірусів, присутність яких очікується в зразку. Після інкубації культури клітин при відповідній температурі під світловим мікроскопом можна визначити, чи з'явилися в клітинах характерні зміни, які є результатом ушкодження клітин вірусом. Зміни такого типу називають цитопатичним ефектом вірусу (мал. 13.6).

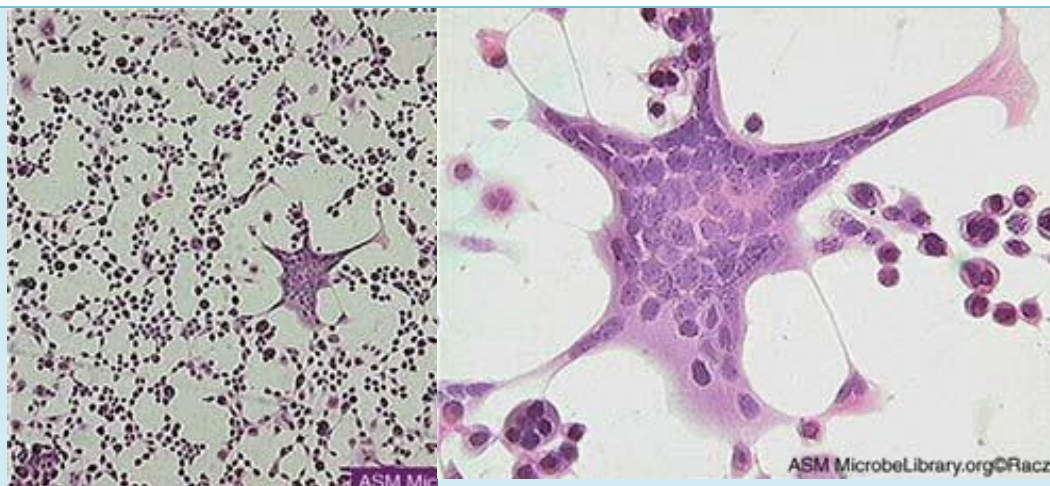
13.4.3. Виявлення вірусних антигенів

Вірусні антигени виявляються з використанням специфічних для вірусу антисироваток або моноклональних антитіл. У більшості подібних методів позитивні результати виявляють по присутності мітки, яку прикріплюють або до антивірусних антитіл (прямий тест), або до вторинних антитіл (мал. 13.7).

Антивірусні антитіла отримують при введенні вірусних антигенів тварині одного виду; вторинні антитіла отримують при введенні імуноглобулінів з тваринного першого виду тварині другого виду.

До антивірусних антитіл можуть бути прикріплені різні види міток, які можуть виявлятися різними методами; деякі приклади наведені в таблиці нижче.

Мітка	Метод виявлення мітки
Фермент	Імуноферментний аналіз (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)
Флуоресцентна	Флуоресцентна мікроскопія, флуорометрія
Золото	Електронна мікроскопія
Радіоактивна	Авторадіографія
	
Здорові клітини культури Vero	Клітини, уражені вірусом поліомієліту



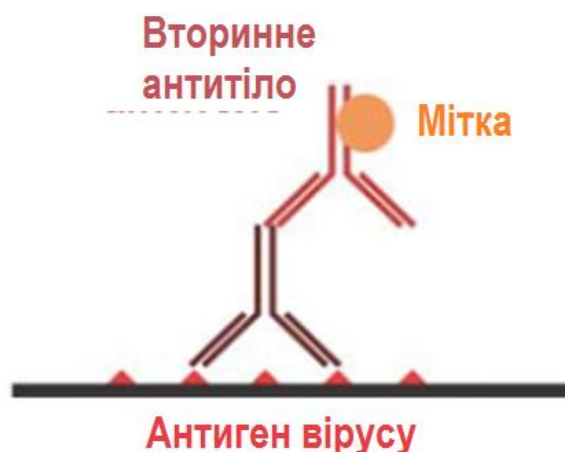
Клітини, уражені вірусом звичайного герпесу

Мал. 13.6. Цитопатичні ефекти, викликані реплікацією поліовірусу і вірусу простого герпесу в культурі клітин Vero (клітини нирки мавпи). Клітини, заражені поліовірусом, зморщилися і стали округлими, тоді як мембрани заражених вірусом герпесу клітин зливаються з утворенням велетенського багато-ядерного синцитію.

Прямий тест



Непрямий тест



Мал. 13.7. Визначення вірусних антигенів з використанням мічених антитіл.

13.4.4. Визначення нуклеїнових кислот вірусу

13.4.4.1. Гібридизація

Вірусні геномні нуклеїнові кислоти або матричні РНК вірусів можна виявити з використанням специфічних ДНК-зондів, які несуть відповідні мітки. Гібридизація проводиться на поверхні мембран після Саузерн-блоттингу, який використовується для виявлення ДНК, або Нозерн-блоттингу, який використовується для виявлення специфічних РНК. Крім того, тонкі зрізи тканин можуть використовуватися для виявлення специфічних нуклеїнових кислот гібридизацією *in situ*.

13.4.4.2. Полімеразна ланцюгова реакція

Коли зразок імовірно містить невелике число копій нуклеїнової кислоти вірусу, вірогідність її виявлення може бути збільшена за допомогою ампліфікації вірусної ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції; РНК може бути скопійована у форму ДНК і потім ампліфікована за допомогою так званої RT(reverse transcriptase)-PCR.

Ця методика вимагає наявності олігонуклеотидного праймера, специфічного для послідовності вірусної нуклеїнової кислоти. Ампліфікований продукт визначається електрофорезом в гелі агарози, з подальшим перенесенням на мембрану нітроцелюлози і інкубацією з міченим зондом.

Метод так званої ПЦР в реальному часі дозволяє визначити число копій специфічної нуклеїнової кислоти в зразку.

13.5. Вивчення генетики вірусів

13.5.1. Послідовності геномів

Використання методів аналізу послідовності геномної нуклеїнової кислоти дозволяє отримати багато інформації про віруси. З використанням комп'ютерних спеціальних програм, в геномах вірусів виявляються відкриті рамки зчитування і передбачаються властивості кодованих ними білків, наприклад чи є білки асоційованими з мембранами і/або якою ферментативною активністю вони володіють. Ідентифікуються регулюючі послідовності, наприклад промотори і енхансери. На підставі послідовності нуклеотидів для певних груп вірусів будуються філогенетичні відносини. У випадку спалахів захворювання, аналіз послідовності може дозволити виявити важливу епідеміологічну інформацію, наприклад походження штаму, що викликав захворювання.

13.5.2. Маніпуляції з геномами вірусів

Для маніпуляцій з нуклеїновими кислотами вірусів, особливо ДНК, доступне досить широке коло методів. Ці методи дозволяють виділити специфічний фрагмент генома, клонувати цей фрагмент у бактерійній плазміді і ввести сайт-специфічні мутації у вірусний геном. Природний процес рекомбінації або пересортовування вірусних геномів може бути відтворений в лабораторії для отримання нових генотипів вірусів.

13.5.3. Дослідження функції і експресії генів

Функції гена можуть бути з'ясовані, якщо його експресія блокована. У численних дослідженнях були використані віруси з мутантними генами. Впродовж більш менш тривалого часу були розроблені і використовуються методи роботи в цьому аспекті з ДНК-вмісними вірусами. Відносно нещодавно були розроблені відповідні методи для РНК-вмісних вірусів. Ці методи називають зворотною генетикою, і вони включають зворотну транскрипцію, тобто синтез ДНК на геномній РНК, впровадження мутації в ДНК, і потім транскрипція з отриманням геномної РНК, такої, що несе потрібну мутацію.

Окрім мутацій, для блокування експресії генів використовується сайленсінг РНК, тобто захисний механізм хазяїна. Для сайленсінг генів використовують короткі послідовності дволанцюгової РНК, комплементарної генам, які намагаються заглушити.

Експресію генів вірусу і клітини хазяїна вивчають з використанням ДНК-мікрочіпа (DNA-microarray).

Додаткове читання до глави 13.

1. Антонова О.С., Рудницкая Г.Е., Тупик А.Н., Буляница А.Л., Евстапов А.А., Курочкин В.Е. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик // Научное приборостроение.— 2011.— Т.21, № 4.— С. 5–21.
2. Носик Н.Н., Стаханова В.М. Лабораторная диагностика вирусных инфекций // Клинич. микробиол. и антимикроб. химиотерапия.—2000.—Т.2,№2.—С. 70–78.
3. Curry A., Appleton H., Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future // Micron.— 2006.—V.37,№2.— P. 91–106.

4. Hazelton P.R, Gelderblom H.R. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations // *Emerg. Infect. Dis.*– 2003.–V.9, №3.–P.294–303.
5. Niesters H.G. Molecular and diagnostic clinical virology in real time // *Clin. Microbiol. Infect.* –2004.V.10,№1.–P.5–11.
6. Schramlová J., Arientová S., Hulínská D. The role of electron microscopy in the rapid diagnosis of viral infections – review // *Folia Microbiol.* – 2010.–V.55,№1.–P.88–101.
7. Tang P., Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses // *Future Microbiol.* –2010.–V. 5,№2.–P.177–189.
8. Watzinger F., Ebner K., Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR // *Mol. Aspects Med.*– 2006.–V. 27,№2-3.–P.254–298.