

Министерство образования Республики Беларусь
УО «Полесский государственный университет»

**НЕКЛЕТОЧНЫЕ ИНФЕКЦИОННЫЕ АГЕНТЫ
МИКРООРГАНИЗМОВ, ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Учебно-методическое пособие

*Рекомендовано учебно-методическим объединением
по естественнонаучному образованию
в качестве учебного издания для студентов учреждений высшего образования,
обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)»*

Пинск
ПолесГУ
2022

УДК 578(075.8)
ББК 28.3
Н47

Р е ц е н з е н т ы:

Кафедра клинической микробиологии
УО «Витебский ордена Дружбы народов государственный медицинский университет»
(заведующий кафедрой: доктор медицинских наук, профессор И. И. Генералов);
профессор кафедры микробиологии Белорусского государственного университета,
кандидат биологических наук, доцент В. В. Лысак

У т в е р ж д е н о
научно-методическим советом ПолесГУ

Р е к о м е н д о в а н о
учебно-методическим объединением по естественнонаучному образованию
в качестве учебного издания для студентов учреждений высшего образования,
обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)»

Н47 Неклеточные инфекционные агенты микроорганизмов, человека и животных :
учебно-методическое пособие / сост.: М. М. Воробьева [и др.]. – Пинск : ПолесГУ,
2022. – 100 с.

ISBN 978-985-516-718-2

В учебно-методическом пособии рассмотрены вопросы: история открытия и изучение неклеточных инфекционных агентов; морфология и состав вирусных частиц; онтогенез вирусов; разнообразие вирусов наряду с традиционными объектами вирусологии, а именно вирусами высших растений, бактериофагами и вирусами животных; способы защиты и предотвращения вирусных инфекций.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов специальности «Биология (по направлениям)». Оно также может быть полезно исследователям в разных областях биологии и других естественных наук, желающих пополнить и упорядочить свои знания в области вирусологии.

УДК 578(075.8)
ББК 28.3

ISBN 978-985-516-718-2

© УО «Полесский государственный университет», 2022.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	4
1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	5
1.1 Неклеточные инфекционные агенты: история открытия и методы идентификации	5
1.1.1 Исторические факты	5
1.1.2 Методы идентификации вирусов	9
1.2 Особенности структурной организации вирусов	13
1.2.1 Классификация вирионов	14
1.2.2 Структура и химический состав вириона	16
1.3 Онтогенез вирусов	19
1.4 Вирусы высших растений	24
1.4.1 Семейства вирусов растений	24
1.4.2 Жизненный цикл вирусов растений	26
1.4.3 Вироиды	28
1.4.4 Экономический ущерб от вирусных инфекций	28
1.5 Бактериофаги	29
1.5.1 Классификация бактериофагов	30
1.5.2 Жизненный цикл фага	32
1.5.3 Обнаружение бактериофагов и их практическое применение	39
1.6 Патогенные вирусы животных и человека	41
1.6.1 Цикл развития вирусов животных и человека	42
1.6.2 Клеточный тропизм	44
1.6.3 Разнообразие вирусов животных и человека	44
1.6.4 Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК	45
1.6.5 Вирусы животных и человека, содержащие геномную ssДНК	55
1.6.6 Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК	57
1.6.7 Вирусы, содержащие геномную ssРНК(+) и не имеющие стадию обратной транскрипции	60
1.6.8 Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(-)	69
1.6.9 Вирусы животных, содержащие ssРНК(+) и имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство <i>Retroviridae</i>	79
1.6.10 Вирусы животных, содержащие dsДНК и имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство <i>Hepadnaviridae</i>	83
2 ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	87
Лабораторная работа № 1 «Методы изучения вирусов»	87
Лабораторная работа № 2 «Заражение вирусами куриных эмбрионов»	89
Лабораторная работа № 3 «ДНК и РНК вирусы, патогенные для человека и животных»	94
Лабораторная работа № 4 «Антивирусная терапия»	95
Лабораторная работа № 5 «Титр бактериофага, способы его определения. Получение фаговых лизатов»	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	99

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данное учебно-методическое пособие написано в соответствии с программой курса «Вирусология», который читается авторами для студентов специальности «Биология (по направлениям)». В нем представлены сведения об истории открытия и изучении неклеточных инфекционных агентов, морфологии и составе вирусных частиц. Концептуально объясняется природа вирусов, онтогенез вирусов, а также разнообразие вирусов, наряду с традиционными объектами вирусологии (вирусами высших растений, бактериофагами и вирусами животных), способы защиты и предотвращения вирусных инфекций.

При изложении материала необходимо было выполнить сложнейшую задачу – максимально упростить его подачу, не перегружая учебно-методическое пособие избыточной информацией. В связи с этим авторы постарались сделать акцент на структурную организацию вирусов, онтогенез и заболевания, вызванные данными неклеточными инфекционными агентами.

Поскольку биологию вирусов нельзя изучать в отрыве от биологии их хозяев, учебно-методическое пособие рассчитано на подготовленного читателя, владеющего азами микробиологии, цитологии, физиологии, молекулярной генетики и иммунологии.

Минимально необходимый набор иллюстраций позволит читателю разобраться в структуре и функциональных свойствах вирусов, а список рекомендуемой литературы, совместно с перечнем важнейших вирусологических сайтов, – облегчить самостоятельный поиск расширенной информации.

Авторы-составители выражают огромную благодарность рецензентам и коллегам, внесшим вклад в подготовку данного издания. Кроме того, авторы заранее благодарны читателям за критические замечания, которые могут быть высказаны по обсуждаемым вопросам, отдавая себе полный отчет в том, что все эти вопросы будут еще долгое время занимать умы многих людей, и окончательный ответ на них будет получен лишь в результате новых научных достижений.

1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1 Неклеточные инфекционные агенты: история открытия и методы идентификации

1.1.1 Исторические факты

Неклеточные инфекционные агенты микроорганизмов – вирусы животных и человека – изучает общая и частная вирусология.

Общая вирусология рассматривает вопросы, связанные с происхождением и строением вирусов (химический состав и устройство генетического аппарата), способы взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином, противовирусный иммунитет, а также методы корректной диагностики вирусных заболеваний. Частная вирусология изучает возбудителей вирусных заболеваний микроорганизмов, растений, животных и человека, вопросы их патогенеза, лабораторной диагностики, специфической профилактики и терапии.

Экскурсия в историю вирусологии показывает, что у вирусов не было первооткрывателя. Ни одного из тех, кто проводил самые первые исследования вирусов и кого мы теперь называем классиками вирусологии, нельзя персонально называть «отцом» этой науки. При попытке объяснить феномены, связанные с существованием и поведением вирусов, первопроходцы вирусологии опирались на ресурс идей и методов своего времени.

Формальной годом открытия вирусов можно считать 1939 г., когда в журнале «Естествознание» появилась публикация немецких вирусологов Г. Кауше, Э. Пфанкуха и Г. Руски, в которой было представлено морфологическое описание вируса табачной мозаики размером 18×300 нм.

Тем не менее, макроскопическое проявление последствий вирусной инфекции отмечалось многими ботаниками, зоологами и микробиологами задолго до изобретения электронного микроскопа. Описания симптомов заразных болезней человека и растений встречаются в древнекитайских и санскритских трактатах, трудах римских историков и византийских хронистов, а также в энциклопедических трактатах «отцов» медицины. Так, например, первые упоминания о самой грозной инфекции прошлого – натуральной оспе – найдены в древнегреческих папирусах за 12 веков до нашей эры. На коже мумии фараона Рамзеса V (1085 г. до н. э.) обнаружены типичные оспенные поражения (**Рис. 1**).



Рис. 1 – Мумия фараона Рамзеса V (типичные оспенные поражения)
[<https://ria.ru/20200730/1575129745.html>]

Другое вирусное заболевание описал основоположник научной медицины древнегреческий врач Гиппократ (160–370 гг. до н. э.). Это заболевание приводило к укорочению и деформации ног, а также к пожизненной хромоте. В 1874 г. оно получает современное название – полиомиелит (**Рис. 2**).



Рис. 2 – Египет (Мемфис): мужчина с деформированной стопой, опирающийся на костыль – жертва полиомиелита
[<https://agritura.livejournal.com/196792.html>]

Согласно литературным данным, первый способ для предотвращения натуральной оспы – вариоляция. Люди вдыхали высушенные корки от поражений оспы (как нюхательный табак) или, в более поздних модификациях, вносили гной из очага поражения в царапину на предплечье.

Э. Дженнер – английский врач, перенес вариоляцию в очень тяжелой форме. Именно он почти за 100 лет до открытия вирусов впервые использовал вакцину для предупреждения этой страшной болезни. Э. Дженнер обратил внимание на тот факт, что молочницы, ухаживающие за больными животными, иногда заболевали в крайне слабой форме оспой коров, но при этом никогда не болели натуральной оспой. Через 30 лет после начала своих изысканий, в 1796 г., Э. Дженнер решился на испытание на человеке метода вакцинации коровьей оспой. Он использовал 14 мая этого же года материал, зараженный коровьей оспой, полученный от руки Сары Немес, доярки из его родной деревни Беркли,

в Глостершире (Англия), для вакцинации 8-летнего Джеймса Фиппса. Эксперимент прошел успешно, и с тех пор способ вакцинации по Э. Дженнеру нашел широкое применение во всем мире (Рис. 3).



Рис. 3 – Вакцинация 8-летнего Джеймса Фиппса
[<https://tech.onliner.by/2020/07/09/glavnyj-vrag-chelovechestva>]

Несмотря на большой практический вклад Э. Дженнера в борьбу с оспой, его исследования носили частный характер и касались лишь одного конкретного заболевания.

В 1879 г. Л. Пастер наблюдал патогенность возбудителя куриной холеры. Одна из пробирок с возбудителем была забыта в термостате перед уходом на летний отдых. По возвращению из отпуска ученый возобновил опыты с куриной холерой. В результате ни одна из птиц, зараженных состарившейся культурой, не заболела. Более того, введение таким птицам свежеприготовленного возбудителя также не вызывало инфекционного процесса.

Из этого простого наблюдения Л. Пастер делает следующий вывод: состарившаяся культура, потеряв свою патогенность, остается способной создавать устойчивость к инфекции. Этот случай определил на многие десятилетия принцип получения вакцинного материала – тем или иным способом добиваться снижения вирулентности патогена при сохранении его иммуногенных свойств.

За семь лет до открытия вирусов Луи Пастер опробовал вакцину на человеке против бешенства. В 1885 г. девятилетнего мальчика укусила бешеная собака. Сельский врач посоветовал его матери обратиться к уже знаменитому тогда Л. Пастеру. Мать привезла ребёнка в Париж, где Пастер как раз закончил успешные опыты на животных, вакцинируя собак ослабленным вирусом. Проблема состояла в том, что у Пастера не было лицензии врача, так что лечить ребёнка он по закону права не имел. Однако было совершенно ясно, что без лечения мальчик умрёт, поэтому Пастер решился (Рис. 4).

Жозефу Мейстеру на протяжении 14 дней вводились всё более сильные дозы вакцины, и в результате он так и не заболел бешенством. Успех опыта привёл к быстрому развитию лечения бешенства и вакцинации от него. Для обозначения заразного материала Л. Пастер предложил использовать слово «вирус» – яд.



Рис. 4 – Л. Пастер испытывает вакцину против бешенства на 9-летнем мальчике Жозефе
[\[https://pikabu.ru/story/pro_lui_pastera_privivki_i_beshenstvo_5176726\]](https://pikabu.ru/story/pro_lui_pastera_privivki_i_beshenstvo_5176726)

В 1886 г. немецкий химик А. Майер, преподававший в университете г. Вагенинген (Голландия), заинтересовался патологией растений табака, которая выражалась в появлении на темно-зеленой листовой поверхности светло-зеленых пятен. Ему удалось выявить, что болезнь, которую он назвал «мозаичной», имеет инфекционную природу: патологический признак передавался от растения к растению с соком мозаичных листьев.

Хотя А. Майер не обнаружил возбудителя табачной мозаики (теперь мы знаем, что это вирус), он по косвенным признакам установил, что последний инактивируется при 80 °С, и предположил, что это бактерии.

Открытие вирусов принадлежит по праву нашему соотечественнику. 12 февраля 1892 г. Д. И. Ивановский, никому не известный 28-летний выпускник кафедры физиологии растений Петербургского университета, доложил на заседании Ученого Совета Академии наук о своих наблюдениях, в ходе которых им было экспериментально доказано, что болезнь табака – табачная мозаика – вызывается некоторым агентом, легко проходящим через бактериальные фильтры. Д. И. Ивановский вводил сок пораженного растения, освобожденный от бактерий, здоровому растению, и оно заболело. Культивировать возбудителя на питательных средах оказалось невозможным. Отсюда Д. И. Ивановский пришел к выводу, что возбудитель имеет необычную природу: он фильтруется через бактериальные фильтры и не способен расти на искусственных питательных средах. Новый тип возбудителя автор назвал «фильтрующиеся бактерии».

Через шесть лет (1898) голландский ученый М. Бейеринк повторил опыты Д. И. Ивановского, придя к аналогичному заключению:

- 1) инфекционный агент не просто фильтруется, а диффундирует через слой агарового геля;
- 2) заражаются только растущие ткани растения, и инфекционный агент размножается в клетках, но не *in vitro*;
- 3) инфекционный агент сохраняет активность после замораживания или высушивания, однако инактивируется при кипячении.

М. В. Бейеринк пришел к выводу, что возбудитель табачной мозаики представляет собой «заразную живую жидкость» в отличие от бактериального, или «корпускулярного», инфекционного начала. Иными словами, он считал: этот возбудитель – молекула,

которого диффундирует в агаре, теряет активность даже при таком слабом воздействии, как нагрев до точки кипения воды (тогда еще не знали, что биологические макромолекулы подвержены температурной денатурации); обладает инфекционностью и патогенностью, а главное – молекулой, которая размножается в живой клетке. Таким образом, М. В. Бейеринк гениально угадал небактериальную природу возбудителя табачной мозаики, хотя ошибочно принял внеклеточную форму вируса за молекулу (в действительности вирусная частица является надмолекулярным образованием).

Заслуга М. В. Бейеринка состоит в том, что он фактически предложил концепцию неклеточной формы жизни. В этот же период немецкие микробиологи Ф. Лефлер и П. Фрош (1898) установили, что ящур, инфекционная болезнь крупного рогатого скота, симптомами которой служат эрозия межкопытной щели и спазм дыхательных мышц, передается с фильтратом через свечу Шамберлана. Поскольку возбудитель ящура не выявлялся микроскопированием и не размножался на питательных средах, Ф. Лефлер пришел к выводу, что этот возбудитель – не бактерия, а токсин. Так как эффективность воздействия фильтрата лимфы больного животного при многократных пассажах не уменьшалась, Ф. Лефлер предположил, что этот гипотетический токсин либо имеет необыкновенно высокую активность (даже при разведении 1:10¹⁰), либо размножается в теле жертвы. Вскоре после этого были открыты многие вирусы человека и животных: миксомы (Дж. Санарелли, 1898), африканской чумы лошадей (Фадан, 1900), желтой лихорадки (В. Риид и Дж. Кэрролл, 1901), чумы птиц (Е. Центанни и Б. Грубер, 1901), классической чумы свиней (Д. Швейнитц и А. Дорсе, 1903), бешенства (М. Ремлингер и Е. Риффат-Бей, 1903), лейкемии кур (В. Эллерман и О. Банг, 1908), полиомиелита (К. Ландштейнер и К. Поппер, 1909). В 1911 г. Ф. Раус открыл вирус, вызывающий у кур злокачественные опухоли. Открытие вируса саркомы Ф. Рауса и другие аналогичные наблюдения послужили основанием считать вирусы важными факторами онкогенеза. Концепция М. Бейеринка о неклеточной жизни обрела мощную поддержку в результате открытия феномена бактериофагии в начале XX в.

В 1915 г. английский врач-патолог Ф. Туорт описал «стекловидную трансформацию» колоний бактерии *Micrococcus sp.*, вызванную трансмиссивным литическим агентом. Пытаясь объяснить этот феномен, он предположил, что его вызывает вирус (в том смысле, который вкладывал в данный термин М. Бейеринк). Вскоре после этого (1917) канадский микробиолог Ф. д'Эррель описал феномен спонтанного лизиса жидкой культуры дизентерийной палочки, *Shigella dysenteriae*.

В отличие от Ф. Туорта, который сомневался в вирусной природе литического агента и упорно пытался размножить его на синтетических средах, он был убежден, что имеет дело с молекулой, способной не только разрушать бактерий, но и предварительно использовать их для собственного размножения. Для обозначения агента, вызывающего лизис бактерий, Ф. д'Эррель предложил ныне общепризнанный термин «бактериофаг» (англ. *bacteriophage*, от греч. *bacteria* – палка (в данном случае – бактерия), и *phagos* – прожорливый (здесь – поедаящий бактерий)). Широко используется и редуцированный вариант этого термина – «фаг» (англ. *phage*).

1.1.2 Методы идентификации вирусов

В 1930-е гг. и в последующие десятилетия вирусологи, такие как С. Лурия, М. Дельбрук и др., использовали описанные вирусы в качестве модельных систем для исследования многих аспектов вирусологии, включая структуру вируса, генетику и репликацию. Эти относительно простые неклеточные агенты с тех пор оказались очень важны для нашего понимания всех типов вирусов, включая вирусы человека.

Венгерский эмигрант М. Шлезингер провел в Германии серию аналитических исследований бактериофага, вируса *Escherichia coli*. Он оценил размер вирусных частиц по скорости седиментации при ультрацентрифугировании, доказал их нуклеопротеиновую

природу на основании положительной реакции Фельгена на ДНК и положительной ксантопротеиновой реакции на белок, наблюдал в световой микроскоп и подсчитал их.

В 1935 г. американский вирусолог У. Стэнли изучил состав вирусов при помощи фракционного осаждения сульфатом аммония. Таким образом, из сока зараженных растений табака он выделил игольчатые кристаллы, оказавшиеся возбудителем мозаичной болезни. Элементарный состав кристаллов был таким же, как у белка – они демонстрировали характерные качественные реакции на белок и денатурировались при нагревании. Тем самым, концепция М. Бейеринка о неклеточной форме жизни получила экспериментальное подтверждение, и через 10 лет за это открытие У. Стэнли был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине (1946). Спустя год после первой публикации результатов У. Стэнли английские вирусологи Ф. Боуден и Н. Пири выяснили, что помимо белка, вирус табачной мозаики содержит около 5 % РНК. Данное открытие прошло незамеченным, поскольку субстратом наследственности считали белок, а не нуклеиновую кислоту. Механизм репродукции вирусов из-за ультрамикроскопического размера и «простого» биохимического состава частицы оставался загадкой. Для объяснения данного процесса необходимо было детализировать архитектуру вирусов и морфологическую картину их взаимоотношений с клеткой-хозяином, что потребовало прибегнуть к помощи электронного микроскопа.

В 1939 г. Г. Кауше с сотрудниками провели первое визуальное наблюдение относительно просто устроенного вируса табачной мозаики. Вслед за этим (1940) они получили первое электронно-микроскопическое изображение бактериофага, имеющего более сложную морфологию (головка, хвостовой отросток и т. д.).

В 1941 г. английский физик Дж. Бернал методом дифракции рентгеновских лучей установил, что оболочка вируса табачной мозаики состоит из повторяющихся белковых субъединиц.

В 1955 г. американский вирусолог Х. Френкель-Конрат установил, что очищенная РНК вируса табачной мозаики и его белковые субъединицы спонтанно воссоединяются в водном растворе, образуя полноценные инфекционные частицы, что теперь называется «эффектом самосборки». Х. Френкель-Конрат, совместно с биохимиком Б. Сингер, реконструировал гибридный вирус табачной мозаики из компонентов, полученных от разных штаммов (1957).

В 1957 г. английский кристаллограф Р. Франклин, получив 3D-реконструкцию вируса табачной мозаики, показала, что молекула РНК свернута в спираль и окружена радиально уложенными белковыми субъединицами. Местом, связавшим ультраструктурное исследование вирусов с изучением механизмов их репродукции, стали результаты опытов, проведенных в 1952 г. американскими вирусологами А. Херши и М. Чейз. Как выяснилось, при заражении *E. coli* бактериофагом Т2 внутрь клетки проникает только вирусная ДНК, тогда как белковая оболочка остается снаружи. Таким образом, установлено, что носителем генетической программы для репликации бактериофага служит не белок, а ДНК. Аналогичную роль РНК как альтернативного носителя генетической информации в 1956 г. доказали немецкие вирусологи А. Гирер и Г. Шрамм, и одновременно с ними Х. Френкель-Конрат, на примере вируса табачной мозаики.

В конце 1930-х – начале 1940-х гг. бактериофаги стали ключевыми модельными объектами при изучении молекулярной природы наследственности и механизмов экспрессии генома. Значительный вклад в изучение бактериофагов, их генетики в частности, внесли американские исследователи М. Дельбрюк, С. Лурия и А. Херши, которые в 1969 г. были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. Они изучили цикл развития и популяционную динамику фагов *E. coli* (Т-фаги 1–7). Дельбрюк, совместно с Дж. Вейглом, провел анализ лизогении на примере фага *лямбда*.

Т. О. Дайнера в 1972 г. открыл вириды, представляющие собой «голые» (лишенные белка) суперспирализованные кольцевые молекулы РНК, вызывающие заболевания у растений.

В 1982 г. группа американских ученых из Калифорнийского университета (США), работающих под руководством Прузинера, открыла прионы и выяснила их белковую природу. Изучение очищенного инфекционного материала показало, что его основной компонент – белок с молекулярной массой 27–30 кДа (кило Дальтона), обозначаемый как Pr 27–30.

За значительный вклад в развитие медицинской вирусологии ряд ученых удостоены Нобелевской премии (Таблица 1).

Таблица 1 – Нобелевские премии 1951–2021 гг. по физиологии и медицине, присужденные за исследования в области медицинской вирусологии

Год присуждения премии	Лауреаты	Результаты исследования
1951	М. Тейлер; ЮАР, США	Разработка вакцины против вируса желтой лихорадки
1954	Д. Эндерс, Ф. Роббинс, Т. Веллер; США	Репродукция вируса полиомиелита в клеточной культуре
1966	П. Раус, Ч. Хиггинс; США	Открытие онкогенных вирусов
1975	Д. Балтимор, Р. Дальбекко, Г. Темин; США	Открытие обратной транскрипции
1976	Б. Блумберг; США	Открытие латентных вирусных инфекций
1978	В. Арбер; Швейцария, США; Д. Натанс, Г. Смит; США	Открытие рестриктаз
1988	Г. Элайон, Д. Блэк, Д. Хитчингс; США	Создание ацикловира
1989	Д. Бишоп, Г. Вармус; США	Открытие ретровирусных онкогенов
1993	Р. Робертс, Великобритания, Ф. Шарп; США	Открытие сплайсинга РНК
2008	Ф. Барре-Синусси, Л. Монтанье, Франция, Х. цур Хаузен; Германия	Открытие вируса иммунодефицита человека, открытие вирусной этиологии рака матки
2020	Х. Дж. Алтер, М. Хаутон, Ч. Райс; США	Открытие вируса гепатита С

Для того чтобы осознать происходящий прогресс в понимании того, что такое «вирусы», следует подробно обсудить методы, используемые в вирусологии. Л. Пастер был первым, кто начал систематически использовать лабораторных животных в работах по изучению вируса бешенства (1881). Его исследования по инокуляции полученного от больных бешенством материала в мозг кролика были провозвестниками более поздних экспериментов, в которых вирусные агенты стали вводить непосредственно в высоковосприимчивый к заболеванию орган или ткань. Другая важная веха – опыты Военной комиссии США по желтой лихорадке, которыми руководил У. Рид и установил, что это первый обнаруженный вирус человека, передающийся трансмиссивным путем и имеющий инкубационный период. Через 30 лет М. Тейлор ввел в систему использование в качестве восприимчивых животных-хозяев мышей. В начале 30-х гг. стали использовать кроме мышей также куриные эмбрионы, т. е. появился еще один источник тканей, чувствительных к заражению вирусами и способных поддерживать их размножение, особенно подходящий для группы поксвирусов. По мере того как появлялись и совершенствовались все эти экспериментальные системы, развивались количественные методы исследований: тестирование на людях лимфы, содержащей вирус осповакцины (1920), и методы определения других вирусов, разработанные после появления работы У. Гарви и Х. Актона с вирусом бешенства (1923). Развитие вирусологии очень зависело от разработки метода культур клеток, которые сначала появились в конце 20-х гг., а затем в 40-х гг. были применены для исследования вирусов энцефалитов. В 1949 г. в эксперименте Дж. Эндерса и других было показано, что культуры клеток способны поддерживать рост вируса полиомиелита. Это открытие свидетельствовало о приходе эры современной вирусологии и послужило толчком к ряду исследований, которые привели к выделению многих вирусов, вызывающих серьезные заболевания у человека, в частности, энтеровирусов и респираторных вирусов.

В 1952 г. Р. Дульбекко применил метод бляшек (негативных колоний) к вирусам животных, и в количественную вирусологию вошли системы культур ткани.

Ф. Д'Эррель считал, что заражение бактерий вирусами может оказаться полезным в лечении болезней, однако ему так и не удалось доказать эту идею или убедить своих коллег в возможности своей правоты. Его открытие было оценено в конце 30-х гг., когда группа ученых занялась исследованием бактериофагов, используя их в качестве модели для изучения взаимодействий «вирус – клетка».

Такого рода данные стали толчком для возникновения молекулярной биологии. Кроме того, бактериофаги сыграли ключевую роль в разработке новых представлений и методов для изучения организации геномов, транскрипции ДНК, трансляции мРНК, генетического кода и в качестве векторов для рекомбинантных ДНК. Методические разработки, использующие генетику, привели к секвенированию вирусных генов.

Представление о том, что возникновение опухолей может быть связано с вирусами, появилось после того, как было обнаружено, что вирус саркомы П. Рауса вызывает опухоли у кур и присутствует в опухолях ряда млекопитающих. Несколько позже было доказано, что вирусные агенты служат причиной появления опухолей у человека. Компоненты вирусов, ответственные за возникновение опухолей, называют вирусными онкогенами. Вирусные онкогены оказались в числе лучших модельных систем, помогающих изучению механизмов онкогенетической трансформации клеток млекопитающих. Обнаружение того, что клетки опухолей человека имеют мутации в тех генах, которые используются РНК-содержащими онкогенными вирусами для трансформации клеток, способствовало выяснению вопроса о том, какие дефекты в опухолевых клетках ответственны за индукцию опухоли.

Исторически сложилось так, что ученые большую часть усилий затратили на идентификацию вирусов различных болезней – они изучали патологию болезни и определяли, является ли возбудителем вирус. Однако вирусы растений и животных сыграли важную роль не только в тех областях, где непосредственно изучают болезни человека и животных, но и в смежных с ними, например, в биохимии.

В 1935 г. был закристаллизован вирус табачной мозаики, вскоре появились кристаллы других вирусов растений, а вирус человека (полиомиелит) – только в 1955 г. Позднее стала возможна кристаллизация индивидуальных вирусных белков, таких как геммагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа, а также целого интактного вириона – вируса кустистой карликовости томата.

В 60-е гг. XX в. появился метод центрифугирования в градиенте плотности. Это позволило идентифицировать составляющие вирусов, что способствовало более подробному изучению путей сборки вирусной частицы. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле позволил разделить белковые смеси. Первоначально это было сделано с вирусом полиомиелита, а затем с более сложными вирусами. В 60-х – начале 70-х гг. открыт ряд ферментов вирусов, в частности, РНК-полимераза, обратная транскриптаза, ферменты, осуществляющие кэппинг мРНК.

Изучение экспрессии генов у вирусов эукариот современными методами биохимии нуклеиновых кислот дало фундаментальную информацию о молекулярной биологии самих эукариот: наличие полиадениловой последовательности на 3'-конце мРНК и сплайсинг впервые выявили у вирусов животных; сигнальные последовательности впервые определены для вирусных мРНК. Сложная структура вируса была описана в 1940 г. благодаря применению электронной микроскопии. На ранних стадиях исследований были измерены размеры вирусных частиц.

Существенным достижением было появление метода *негативного контрастирования*, который позволил проводить анализ нефиксированных препаратов и неочищенных вирусных суспензий. Это позволило выяснить, что вирусные капсиды бывают спиральными и икосаэдрическими. Позже электронную микроскопию применили для идентифи-

кации «капризных» по своим ростовым свойствам вирусов, таких как возбудители вирусных гастроэнтеритов и гепатита. Кроме того, этот метод сыграл главную роль в идентификации этиологических агентов подострого склерозирующего панэнцефалита и прогрессирующего очагового лейкоэнцефалита. Вирусологи считают одной из своих задач поиск путей предотвращения вирусных заболеваний. По мере решения этой задачи развивались представления о двух формах иммунитета – клеточного и гуморального.

В начале XX ст. методы иммунологии сыграли важную роль в классификации вирусов и изучении природы противовирусного иммунитета. При этом следует отметить метод *гемагглютинации*. Он позволяет производить быструю проверку на присутствие вируса, поверхностные белки которого вызывают агглютинацию эритроцитов. Этот метод сыграл важную роль в изучении вирусов и в развитии методов их количественного определения так же, как и радиоиммунный анализ, который появился в 60-е гг. и сразу же стал мощным инструментом быстрой высокочувствительной идентификации и анализа вирусов иммунологическими средствами. Наконец, с помощью появившихся в последнее десятилетие моноклональных антител возникла возможность идентифицировать специфические области вирусных белков – благодаря этому в руках исследователей оказался чрезвычайно специфический тест на индивидуальные вирусные белки.

Важное влияние на развитие вирусологии оказывают также исследования, связанные с культивированием и клонированием различных Т-лимфоцитов. Возможность их культивировать позволила иммунологам определить роль клеток различных типов в защите против вирусных инфекций. Т-клетки использовали для выделения и идентификации вирусов, растущих в лимфоидных клетках данного типа (вирус Т-клеточного лейкоза человека). Сочетание моноклональных антител с методами молекулярного клонирования и рекомбинантных ДНК привело к возникновению нового подхода, с помощью которого был выделен и идентифицирован рецептор Т-клеток. Совершенно очевидно, что это, в конечном счете, позволит точно идентифицировать функции и специфичность узнавания различных Т-клеток.

На сегодняшний день в вирусологии развиваются разные методы и изучаются разные проблемы, главной среди которых – профилактика и лечение вирусных заболеваний. Первая вакцина для людей против оспы привела к ликвидации заболевания. Другие вакцины, например, против желтой лихорадки, позволили снизить уровень заболеваемости. Некоторые вакцины – против полиомиелита, кори, свинки и краснухи – радикально изменили форму и ослабили течение заболевания. Тем не менее, на сегодняшний день имеется ряд вирусных агентов, против которых нет эффективных вакцин или вакцины имеют ограниченное применение.

1.2 Особенности структурной организации вирусов

Вирусы составляют особое царство *Vira*, занимающее промежуточное положение между живой и неживой природой, и характеризуются чрезвычайно малыми размерами (10–300 нм в диаметре), облигатным внутриклеточным паразитизмом, отсутствием самостоятельных белоксинтезирующих и генерирующих энергию систем. Особенностью их размножения является отдельный синтез вирусных компонентов (нуклеиновой кислоты и белков) в живой клетке с последующей сборкой их в зрелые вирусные частицы. Вирусы могут существовать в трех формах – вирион (зрелая вирусная частица), в репродуктивной форме и форме провируса. Вирион представляет собой внеклеточную покоящуюся форму вируса, выполняющую функцию переноса его генома из одной клетки в другую. Вирионы характеризуются определенной устойчивостью, постоянной структурой, химическим составом и имеют определенные размеры. Репродуктивная форма вируса соответствует внутриклеточной стадии его развития. Провирус – это форма интеграции генома некоторых вирусов с геномом клетки-хозяина, при которой репродукции вируса не происходит.

1.2.1 Классификация вирионов

1. В зависимости от формы:
 - а) сферические (вирус полиомиелита, вирус ящура, вирус герпеса, мелкие бактериофаги, вирус мозаики гвоздики, вирус лейкоза мышей, кур);
 - б) палочковидные (вирус табачной мозаики, вирус мозаики томатов, вирус огуречной мозаики, вирусы картофеля: x, y, z);
 - в) пулевидные (вирус бешенства, везикулярный стоматит);
 - г) нитевидные (вирус Марбурга, вирус Эбола, фитопатогенные вирусы и ДНК-бактериофаги);
 - д) овальные (вирус натуральной оспы).
2. В зависимости от размера:
 - а) мелкие вирусы (10–30 нм) – вирус ящура, вирус желтой лихорадки, вирус полиомиелита, вирус папилломы, вирус гепатита, вирус лейкоза КРС и птиц;
 - б) средние вирусы (30–150 нм) – вирус бешенства, вирус гриппа, вирус герпеса, вирус кори, простые бактериофаги;
 - в) крупные вирусы (150–400 нм) – вирус оспы, вирус табачной мозаики, сложные бактериофаги.

Большинство вирусов имеют размеры в пределах от 10 до 400 нм. Таким образом, мельчайшие вирусы (вирусы ящура, полиомиелита и др.) сопоставимы по размерам с рибосомами клеток, следовательно, визуально могут быть обнаружены только в электронном микроскопе. Крупные вирусы (большинство вирусов оспы млекопитающих) имеют размеры мелких бактерий и поэтому могут быть увидены в световом микроскопе. Молекулярная масса вируса зависит от их размера: вирус гриппа – 700×10^6 Да, вирус папилломы кролика – 25×10^6 Да, вирус осповакцины – 8500×10^6 Да, вирус герпеса – $(84–160) \times 10^6$ Да.

1. В зависимости от наличия или отсутствия оболочки:
 - а) простые (пикорна-, парвовирусы) – капсид образован одним или несколькими видами белка, окружающего молекулу нуклеиновой кислоты. Капсид простых вирусов представлен α -спиральными белками.
 - б) сложные (арено-, поксвирусы) – кроме капсида, имеется еще дополнительная внешняя оболочка – суперкапсид. Он образован из плазматической мембраны клетки-хозяина.

Суперкапсид встречается только у сравнительно крупных вирусов (грипп, герпес) и выполняет защитную функцию. В составе суперкапсида выделяют внутренний белковый слой (М-белок), внешний объемный слой липидов и углеводов (компонентов мембран клетки-хозяина) и поверхностные гликопротеиды. Вирусспецифические гликопротеиды встраиваются в липидный бислой, образуя разные по форме выпячивания, например, шипы. Шипы могут иметь разную форму: палочковидную – у тогавирусов; форму бутылки – у парамиксовирусов; форму солнечной короны – коронавирусов (Рис. 5). Капсид и суперкапсид защищают вирусный геном от внешних воздействий, обеспечивают адсорбцию вириона на клетке, проникновение его в клетку путём взаимодействия с клеточными рецепторами.

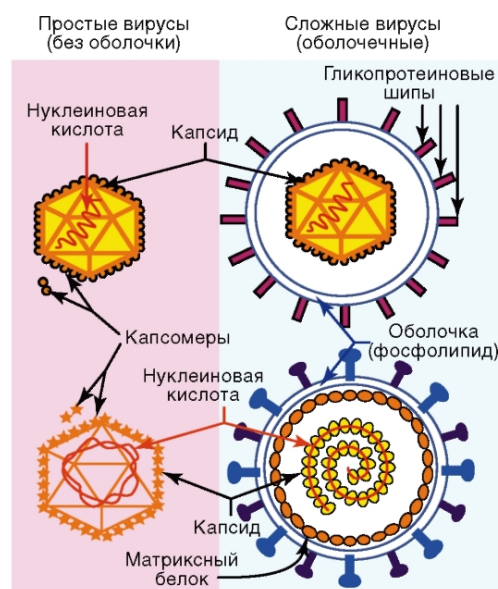


Рис. 5 – Строение вирусов в зависимости от наличия или отсутствия оболочки [https://studopedia.org/14-95610.html]

2. В зависимости от типа симметрии капсомеров выделяют капсид:
- со спиральным типом симметрии – капсомеры ассоциируются с геномом и образуют спиралевидную, винтообразную структуру. Нуклеокапсиды большинства патогенных для человека вирусов имеют спиральную симметрию. К этой группе принадлежат вирусы растений и некоторые бактериофаги. Организация по принципу спиральной симметрии придаёт вирусам палочковидную форму (**Рис. 6а**);
 - с кубическим типом симметрии – нуклеиновая кислота окружена капсомерами, образующими фигуру икосаэдра – многогранника с 12 вершинами, 20 треугольными гранями и 30 углами. Организация по принципу кубической симметрии придаёт вирусам сферическую форму. Для его организации используются сравнительно небольшие белковые блоки, образующие большое внутреннее пространство, в которое свободно укладывается нуклеиновая кислота (**Рис. 6б**).

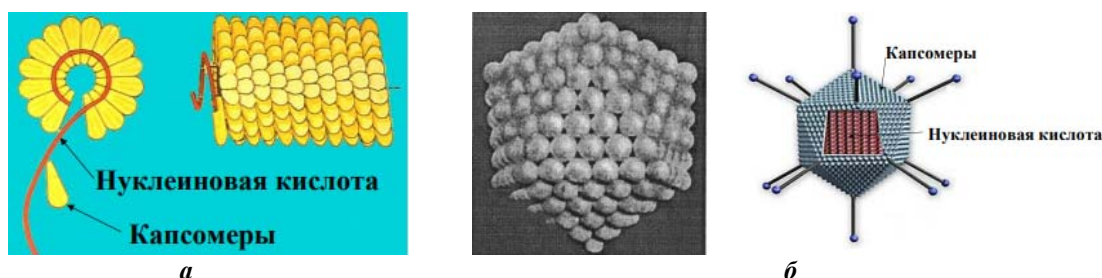


Рис. 6 – Тип симметрии капсомеров капсида вириона: а – спиральный; б – кубический
[Литусов Н. В., Устюжанин А. В., 2012 г.]

По типу икосаэдра построены многие мелкие вирусы (пикорнавирусы) и нуклеокапсиды большинства сложных вирусов, преимущественно поражающих человека и животных. Например, вирион полиомиелита представляет икосаэдр, состоящий из 60 капсомеров; вирион парвовируса – из 32 капсомеров. Для описания икосаэдрической упаковки структурных элементов в капсиде введено триангуляционное число (Т). Это число, равное частному от деления числа субъединиц на 60. Так, у вируса некроза табака и фага фХ174 $T = 1$ (60 субъединиц), многие вирусы растений имеют $T = 3$ (180 субъединиц), вирус Синдбис имеет $T = 4$ (240 субъединиц), ротавирус имеет $T13$ (780 субъединиц);

- смешанный тип симметрии – часть вириона построена по спиральному типу, а часть – по кубическому (встречается у некоторых сложных бактериофагов) (**Рис. 7**).

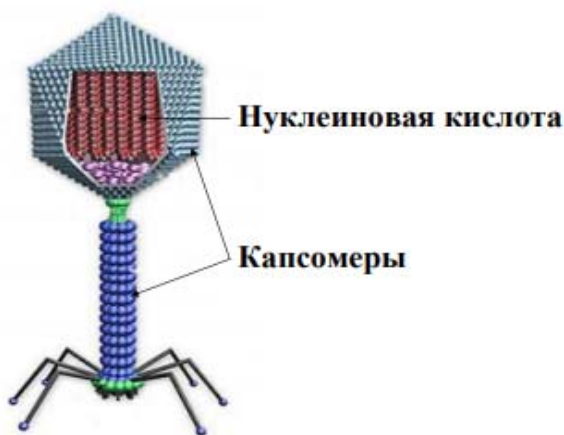
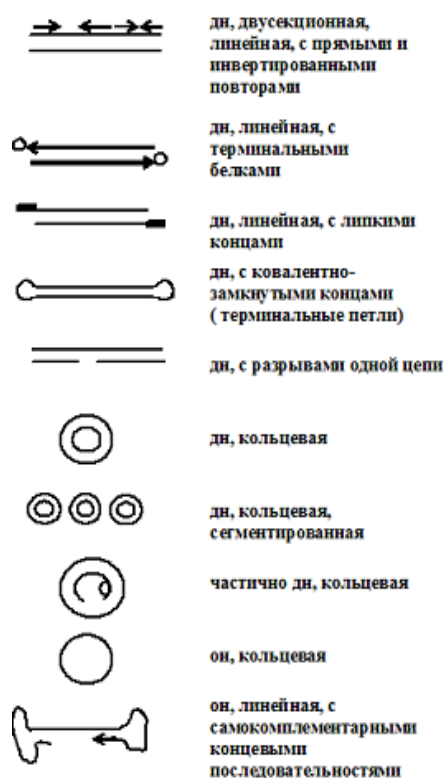


Рис. 7 – Бактериофаг со смешанным типом симметрии
[Литусов Н. В., Устюжанин А. В., 2012 г.]

- отсутствие постоянной симметрии (например, поксвирусов).

3. В зависимости от типа нуклеиновой кислоты:

- ДНК-содержащие вирионы (Рис. 8);
- РНК-содержащие вирионы (Рис. 9).



Герпес вирус

Адено вирус

Фаг T

Покус вирус

Фаг T:

Папиллома вирус

Фаг RM:

Полиома вирус

Гепатит вирус

Фаги φX174

M1:

Парво вирус



(+) КЭп _____ ААА

(+) КЭп _____

(+) _____ ААА

(+) _____

(-) _____



(+) | (-)

(-) ○

(+/-) ○ ○ ○
2 3 4

дн, линейная сегментированная

5'-КЭп, 3'-полиадениловый трек

5'-КЭп, 3'-тРНК-подобная структура

5'- терминальный белок, 3'-полиадениловый трек

5'- и 3'-вторичные структуры в форме петель

он-негативная, линейная

он-негативная, линейная, сегментированная

он-амбисенс, линейная, сегментированная

он-негативная, кольцевая

он-амбисенс, кольцевая

Рео вирусы
Ротавирус (8-11 сегментов)

Артеривирусы
Коронавирусы
Горновирусы

ВТМ

Калицивирусы
Пикорнавирусы
Потивирусы

Вирус гепатита С

Парамиксовирусы
Рабдовирусы

Ортомиксовирусы (7-8 сегментов)

Арена вирусы

Дельта вирус
Гену вирус (сегмент 1)

Гену вирус (сегменты 2, 3, 4)

Рис. 8 – Структурная организация ДНК-геномов вирусов

[<https://rep.polesu.by/handle/123456789/16255>]

Рис. 9 – Структурная организация РНК-геномов вирусов

[<https://rep.polesu.by/handle/123456789/16255>]

1.2.2 Структура и химический состав вириона

По своей структуре вирусы представляют собой геометрически правильные образования, состоящие из центральной части (генома) и одной или двух оболочек. Снаружи нуклеиновая кислота покрыта белковой оболочкой – капсидом (лат. *capsa* – футляр, коробка). Капсид, как чехлом, окружает вирусную нуклеиновую кислоту. Вирусный геном и капсид вместе образуют нуклеокапсид.

Капсид состоит из повторяющихся морфологических субъединиц – капсомеров. Капсомеры являются морфологическими единицами вирусов, видимыми в электронный микроскоп. Число капсомеров строго специфично для каждого вида и зависит от размеров и морфологии вирионов. Каждый капсомер построен из одной или нескольких гомологичных, или гетерологичных полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. Таким образом, каждый капсомер может быть мономерным (содержать один полипептид) либо полимерным (включать несколько полипептидов).

У сложных вирусов, наряду с капсидом, имеется дополнительная оболочка – суперкапсид (пеплос, покрывало). Суперкапсид состоит из двойного слоя липидов и специфических вирусных белков. Суперкапсидная оболочка вируса является модифицированной цитоплазматической мембраной клетки, в которой репродуцировался данный вирус.

На поверхности некоторых оболочечных вирусов располагаются шипы, или шипики (пепломеры, суперкапсидные белки) – это липопротеиновые или гликопротеиновые выступы. Шипы выполняют функцию взаимодействия вирусных частиц с чувствительными клетками. Если удалить шипы детергентом, то вирус полностью теряет инфекционную

активность. У вирусов один тип нуклеиновой кислоты в составе вириона, а в клетках растений, человека и животных может присутствовать оба типа. По присутствию определенного типа нуклеиновой кислоты в вирионе вирусы делятся на ДНК- и РНК-содержащие.

Обычно нуклеиновая кислота вирусов в 10–100 раз меньше по массе, чем нуклеиновая кислота животных и растительных клеток. Нуклеиновая кислота вируса занимает центральное положение в вирионе и упакована в белковый чехол. Форма молекул нуклеиновых кислот, входящих в состав вирусных частиц, значительно разнообразнее, чем у эукариотических и прокариотических организмов (Таблица 2).

Таблица 2 – Форма молекул вирусных нуклеиновых кислот

Для молекулы ДНК	Для молекулы РНК
1) линейная одноцепочечная;	1) одноцепочечная цельная;
2) линейная двухцепочечная с незамкнутыми концами;	2) двухцепочечная сегментированная;
3) линейная двухцепочечная с замкнутыми концами;	3) одноцепочечная сегментированная;
4) циркулярно замкнутые обычные;	4) кольцевая сегментированная;
5) циркулярно замкнутые с нестроеным участком в одной цепи	5) двойная одноцепочечная цельная

Функции нуклеиновой кислоты:

- 1) программирует наследственность;
- 2) участвует в синтезе вирусного белка;
- 3) отвечает за информационные свойства вируса.

Белки вместе с нуклеиновой кислотой сосредоточены в центре вириона и большая часть белка – в капсиде. В состав белков вирусов входят те же аминокислоты, что и в состав остальных белков и построены они по тому же принципу. Белки вирусов выполняют различные функции: выступают в роли рецепторов к чувствительным клеткам, формируют вирусную оболочку и капсид, а также участвуют в репликации вирусной нуклеиновой кислоты.

В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез двух групп белков:

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

Количество структурных белков в составе вирусной частицы может быть разным. Просто устроенные вирусы содержат всего один небольшой белок, например, вирус табачной мозаики с молекулярной массой примерно $17-18 \times 10^3$ Да. Некоторые фаги содержат 2–3 белка, просто устроенные вирусы животных – 3–4 белка, а сложно устроенные вирусы (например, вирус оспы) – более 30 структурных белков.

Структурные белки делятся на две группы: капсидные и суперкапсидные.

В составе капсида вирусов содержатся:

- 1) белки, непосредственно образующие капсид для нуклеиновой кислоты вируса. Их основной функцией является защита вирусного генома от воздействий внешней среды;
- 2) геномные белки, ковалентно связанные с вирусным геномом. Эти белки являются терминальными, т. е. соединенными с концом вирусной нуклеиновой кислоты. Функции их неразрывно связаны с функциями генома и их регуляцией;
- 3) ферменты в составе капсида некоторых сложных вирусов являются ДНК- или РНК-полимеразами (осуществляют транскрипцию и репликацию вирусного генома), а также ферменты, модифицирующие концы мРНК.

Суперкапсидные белки входят в состав наружной вирусной оболочки (суперкапсида). Суперкапсидные белки располагаются в липопротеидной оболочке сложных вирусов. В зависимости от выполняемой функции их делят на:

- 1) прикрепительные – взаимодействуют с рецепторами клеточной поверхности – распознавание клетки-хозяина и прикрепление к ней вирусной частицы (адсорбция);

- 2) белки слияния – участвуют в проникновении вирусных частиц в клетку, т. е. обеспечивают слияние вирусной и клеточной мембран.

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

К неструктурным белкам относятся:

- 1) предшественники вирусных белков, которые отличаются от других неструктурных белков нестабильностью в зараженной клетке в результате быстрого нарезания на структурные белки;
- 2) РНК- и ДНК-полимеразы – ферменты синтеза РНК и ДНК, обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома;
- 3) ферменты, модифицирующие вирусные белки, например, протеиназы и протеинкиназы.

Многие неструктурные белки при ряде вирусных инфекций еще не идентифицированы и функции их не определены. Липиды обнаружены у сложноорганизованных вирусов и в основном находятся в составе липопротеидной оболочки (суперкапсида), формируя ее липидный бислой, в который встроены суперкапсидные белки. Они или пронизывают насквозь липидный бислой, или не доходят до внутренней поверхности. Пепломеры являются типичными внутримембранными белками и имеют много общего с клеточными мембранными белками. Как и последние, они обычно гликозилированы. Гликозилирование осуществляют клеточные ферменты, поэтому один и тот же вирус, продуцируемый разными видами клеток, может иметь разный состав углеводов, длину углеводной цепочки и место прикрепления к полипептидному остову. У большинства вирусов гликопротеиды на поверхности формируют «шипы» длиной до 7–10 нм, построенные из нескольких молекул одного и того же белка. Например, вирусы гриппа и парамиксовирусы имеют два типа шипов, рабдовирусы имеют только один тип шипов. Гликопротеиды состоят из наружной гидрофильной части, которая содержит на конце аминокгруппу (N-конец), и погруженной в липидный бислой гидрофобной части, которая содержит на погруженном конце карбоксильную группу (С-конец). Этим концом полипептид «заякоривается» в липидном бислое. Хотя есть и исключения из этого общего положения: нейраминидаза вируса гриппа взаимодействует с липидным бислоем не С-, а с N-концом. Все сложноорганизованные РНК-содержащие вирусы имеют в своем составе значительное количество липидов (от 15 % до 35 % от сухого веса), а из ДНК-содержащих вирусов – вирус оспы, вирус герпеса и вирус гепатита В. Вирусы, содержащие липопротеидную мембрану, формируются путем почкования через плазматическую мембрану клеток (или через мембрану эндоплазматической сети с выходом во внутриклеточные вакуоли). К почкующимся вирусам относятся крупные РНК-содержащие вирусы: ортомиксо-, рабдо-, тога-, ретро-, бунья-, арено-, парамиксо-, флави-, рео-, фило-, борна- и коронавирусы. В связи с клеточным происхождением липидов общий состав липидной фракции и содержание ее отдельных компонентов у одного и того же вируса могут существенно различаться в зависимости от клетки-хозяина, где происходила репродукция вируса. Наоборот, если разные почкующиеся вирусы репродуцировались в одних и тех же клетках, их липиды оказываются более или менее сходными. У вирусов оспы липиды не образуют дифференцированной оболочки, т. к. они не формируются путем почкования через плазматическую мембрану. Вирус герпеса формируется путем почкования через ядерную оболочку, поэтому в его составе есть липиды ядерной оболочки мембраны. Липиды вируса гепатита В и его НВ s-антигена образуются путем инвагинации мембран эндоплазматической сети, а бунья-вирусы почкуются на мембранах аппарата Гольджи. Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов. Количество сахаров в составе гликопротеидов может быть достаточно большим, достигая 10–13 %

от массы вириона. Химическая специфичность их полностью определяется клеточными ферментами, обеспечивающими перенос и присоединение соответствующих сахарных остатков. Обычными сахарными остатками являются: фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, нейраминная кислота и глюкозамин. Углеводный компонент, подобно липидам, определяется клеткой-хозяином. Один и тот же вирус, выращенный в клетках разных видов, может различаться по составу сахаров, в зависимости от специфичности клеточных гликозилтрансфераз. Углеводный компонент гликопротеидов играет важную роль в структуре и функции белка. Он обеспечивает сохранение конформации белковой молекулы и обуславливает защиту молекулы от клеточных протеаз. Возможные другие функции углеводов, достоверно пока не установленные. Белки и даже целые клеточные структуры клетки-хозяина могут находиться в составе вирионов. Например, в составе ряда оболочечных вирусов может находиться белок цитоскелета актин, в составе паповавирусов содержатся клеточные гистоны. Ряд вирусов содержит клеточные ферменты, например, протеинкиназы. В составе аденовирусов обнаружены рибосомы. Клеточные компоненты могут включаться в вирион случайно или закономерно. В некоторых случаях они играют существенную роль в репродукции вируса, как, например, гистоны в репродукции паповавирусов. Минеральные вещества также входят в состав вирионов. Чаще других обнаруживаются ионы калия, натрия, кальция, железа, а иногда и некоторые другие. Они участвуют в образовании связей между белками и нуклеиновой кислотой.

1.3 Онтогенез вирусов

Репродукцией вирусов называют процесс размножения вирусных частиц в чувствительных к ним клетках. Репродуцируются вирулентные вирусы, т. е. вирусы, обладающие высокой степенью патогенности. У интеграционных вирусов способность к репродукции возникает после исключения (отщепления) их генома от генома клеток. Репродукция вирусов в клетках ведет к патологии: повреждению клеток, тканей и органов, развитию воспаления. Механизмы репродукции вирусов отличаются большим разнообразием, однако основные этапы этого процесса являются общими.

Выделяют следующие стадии продуктивной вирусной инфекции:

- адсорбция вируса на клеточной мембране;
- проникновение в клетку;
- депротенинизация вириона, или «раздевание»;
- биосинтез вирусных компонентов;
- сборка вирусной частицы (морфогенез);
- выход вируса из клетки (**Рис. 10**).

1. Адсорбция вируса на поверхности инфицируемой клетки. Адсорбция происходит путём взаимодействия рецепторов вириона, представленных гликопротеинами, имеющими форму шипов (орто- или парамиксовирусы) или нитей (фибры аденовирусов), со специфическими клеточными рецепторами, при помощи сил неспецифического межмолекулярного взаимодействия (разностью зарядов, водородными или гидрофобными связями) или по типу комплементарности взаимодействующих молекул.

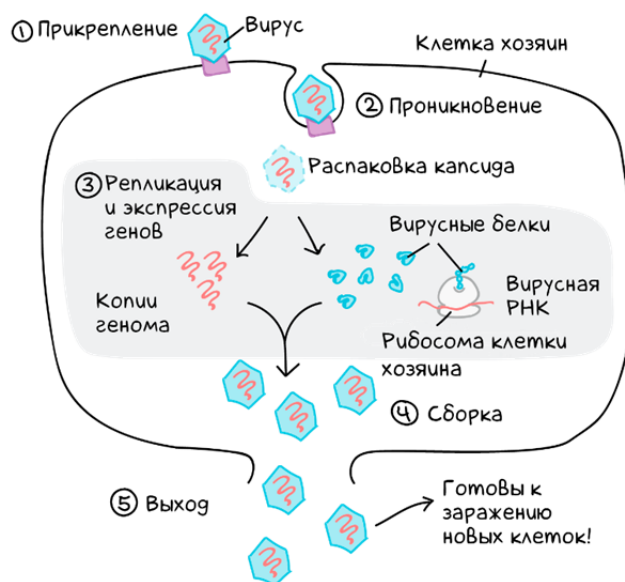


Рис. 10 – Схема жизненного цикла вирусов
[\[https://ru.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/intro-to-viruses\]](https://ru.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/intro-to-viruses)

Число клеточных рецепторов может достигать до 10^4 – 10^5 молекул на мембране одной клетки. Первоначально адсорбция обратима из-за единичных связей между вирионом и клеткой; необратимую адсорбцию обеспечивает множественное поливалентное прикрепление вирусов (до 3000 связей). Рецепторы к вирусам на мембранах клеток очень разнообразны. В ходе эволюции вирусы приобрели сродство (тропизм) ко многим мембранам клеток. В частности, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) при помощи своего рецептора gp120 взаимодействует с молекулой CD4 на клетках системы иммунитета, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) связывается с ангиотензинпревращающим ферментом, риновирусы – с белком межклеточной адгезии ICAM-1, вирус Эпштейна-Барр – с рецептором для C3d-компонента комплемента CD21, ЕСНО-вирусы – с клеточными интегринами, орто- и парамиксовирусы – с рецепторами, содержащими остатки сиаловой кислоты.

Процесс адсорбции протекает в две фазы:

- 1) фаза ионного притяжения обусловлена неспецифическим взаимодействием;
- 2) фаза прикрепления происходит благодаря структурной гомологии либо комплементарности взаимодействующих молекул.

Количество инфекционных вирусных частиц, адсорбированных на клетке, определяет термин «множественность заражения» (инфицирования), т. е. на клетке может сорбироваться большое количество вирионов. Однако инфицированная вирусом клетка обычно толерантна к повторному заражению гомологичным вирусом.

Процессы проникновения вируса в клетку бактерий, растений и животных различны. Вирусы бактерий и растений должны пройти через клеточную стенку, а вирусы животных могут адсорбироваться непосредственно на мембране клетки-хозяина.

✓ Некоторые (но не все) вирусы бактерий (бактериофаги) проходят сквозь клеточную стенку путем «инъекции». В этом случае белковая оболочка вируса остается снаружи клетки, а нуклеиновая кислота впрыскивается через стенку внутрь клетки.

✓ Вирусы растений не обладают специальным аппаратом для преодоления клеточной стенки, поэтому рассматриваются процессы проникновения с помощью переносчиков (насекомые, травоядные животные, сельскохозяйственный инвентарь).

✓ Вирусы животных адсорбируются на мембране клетки-хозяина и могут попасть внутрь клетки двумя путями:

А. «Голые» вирусы проникают в клетку путём эндоцитоза (виropексис: вирус + греч. *rexis* – прикрепление) – происходит на специализированных участках мембраны клетки – ямках, на дне которых имеются рецепторы, а со стороны цитоплазмы белок – клатрин.

При рецепторном эндоцитозе возникает инвагинация клеточной мембраны и образование внутриклеточной вакуоли (эндосомы). Инвагинация обычно происходит в участках мембраны, обогащенных белком клатрином («клатриновые ямки»), или белком кавеолином. Вакуоль с вирусом может попадать в разные участки цитоплазмы или в клеточное ядро с последующим выходом вируса за пределы эндосомы.

Б. Путем слияния проникают сложные вирусы – герпесвирусы, парамиксовирусы, ретровирусы (ВИЧ). Некоторым вирусам для эффективной адсорбции и проникновения требуется наличие дополнительных корецепторов на клеточной мембране. Для ВИЧ корецепторными молекулами на мембране лимфоцитов и макрофагов являются рецепторы к хемокинам CXCR4 и CCR5.

2. Депротенинизация или «раздевание» вирионов – это процесс освобождения вируса от его оболочек (суперкапсида или капсида) с последующим выходом нуклеиновой кислоты в цитоплазму клетки. «Раздевание» вирионов начинается сразу же после их прикрепления к клеточным рецепторам и продолжается в эндоцитарной вакуоли. Кислая среда в эндосоме (рН 5,0–6,0) дополнительно активизирует белки, ответственные за депротенинизацию. Например, у вируса гриппа в этом процессе участвуют ге-

магглютинин, нейраминидаза и матриксный белок М2. Белок М2 формирует ионный канал для протонов, и закисление содержимого вириона приводит к растворению основного матриксного белка М1 вируса гриппа.

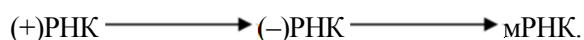
3. Биосинтез компонентов вирусов является сложным и многостадийным. Проникновение вируса в клетку дезорганизует и перестраивает нормальный клеточный метаболизм. В результате синтезируются вирусные нуклеиновые кислоты и белки, которые идут на построение новых вирусных частиц. Особенности репродукции разных вирусов определяются различиями в строении их генома (наличие ДНК или РНК, их полярность, способность к обратной транскрипции). Для вирусов характерна дизъюнктивная (или разобщенная) репродукция: в клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты и белки вирусов, а затем происходит их сборка в вирусные частицы. У большинства ДНК-содержащих вирусов синтез новой геномной ДНК (репликация) и образование информационной РНК (транскрипция) происходит в ядре инфицированной клетки. Вначале в ядре выполняется транскрипция ДНК вируса с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы (характерно для аденовирусов или герпесвирусов). Далее вирусная мРНК перемещается в цитоплазму на рибосомы, где начинается ее трансляция с образованием вирусных белков. «Ранние» белки, синтезированные в клетке еще до репликации вирусного генома, обеспечивают дальнейшую репродукцию вируса. Среди них фермент-вирусная ДНК-полимераза, которая на матрице вирусной ДНК выполняет в ядре синтез новых молекул ДНК генома вируса. Дальнейшие процессы транскрипции и трансляции приводят к синтезу «поздних» белковых молекул, в первую очередь – структурных белков. Если репродукция ДНК-вирусов происходит в цитоплазме клеток (поксвирус), то репликация и транскрипция вирусного генома обеспечивается ферментами самого вируса.

Схематично синтез вирусных мРНК в клетке-хозяине можно представить следующим образом:

- 1) днДНК → мРНК;
- 2) онДНК → днДНК → мРНК;
- 3) частично днДНК → днДНК → мРНК.

РНК-вирусы размножаются в цитоплазме, кроме ретровирусов и вирусов гриппа, репликация которых происходит в ядре. Если у РНК-вирусов геном представлен одной (+)РНК, то она одновременно может выполнять функцию мРНК, с которой непосредственно осуществляется трансляция вирусных белков на рибосомах. Считается, что такая РНК обладает «инфекционностью» – при попадании в клетку она может самостоятельно вызвать инфекционный процесс. Репликация генома у (+)РНК вирусов (флави-, тога-, пикорнавирусы) выполняется вирусным ферментом РНК-полимеразой с образованием промежуточной антисмысловой (-)РНК цепи. При этом в клетке временно образуется фрагмент двухцепочечной РНК. По матрице (-)цепи РНК синтезируется геномная (+)РНК цепь. В свою очередь, (+)цепь РНК служит матрицей для трансляции вирусных белков. У ряда вирусов транслируется вся геномная (+)РНК с образованием единого полипротеина. Далее он нарезается с участием вирусных или клеточных протеаз с образованием конечных структурных вирусных белков (пикорнавирусы, флавивирусы). Дополнительно вирусные белки могут подвергаться гликозилированию, связываться с липидами и т. д.

Схематично синтез вирусных мРНК в клетке-хозяине можно представить следующим образом:



У (-)РНК вирусов (орто-, парамиксовирусов, рабдовирусов и др.) геном с отрицательной полярностью не выполняет функцию информационной РНК, тем самым он не обладает инфекционностью. Такие вирусы имеют РНК-полимеразы (транскриптазы), которые с негативной РНК-цепи генома синтезируют комплементарную смысловую (+)цепь

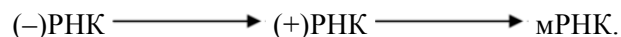
РНК. С молекулы (+)РНК происходит трансляция вирусных белков на рибосомах. Также она служит матрицей для синтеза геномной (-)РНК.

Схематично синтез вирусных мРНК в клетке-хозяине можно представить следующим образом:



Некоторые вирусы содержат сегментированную двунитевую РНК с положительной и отрицательной полярностью (бирнавирусы, реовирусы и ротавирусы). Их вирионы включают фермент транскриптазу. После попадания вирусов в клетку транскриптаза на матрице (-)цепи РНК образует множественные копии (+)РНК. В свою очередь, они служат матрицей для синтеза вирусных белков и геномной (-)цепи РНК.

Схематично синтез вирусных мРНК в клетке-хозяине можно представить следующим образом:



Наиболее сложной представляется репродукция вирусов, обладающих функцией обратной транскрипции. РНК-содержащие ретровирусы, такие как ВИЧ, обладают ферментом обратной транскриптазой (или ревертазой). Данный фермент является РНК-зависимой ДНК-полимеразой и способен синтезировать цепь вирусной ДНК на матрице вирусной РНК (обратная транскрипция). Далее обратная транскриптаза выполняет синтез второй комплементарной нити ДНК. Двунитевая ДНК транспортируется в ядро и при помощи фермента интегразы встраивается в геном клетки. Образуется ДНК-провирус ВИЧ. На матрице ДНК провируса клеточная РНК-полимераза синтезирует геномные (+)РНК вируса ВИЧ, а также вирусные мРНК. Синтезированные РНК транспортируются в цитоплазму, где на рибосомах создаются структурные белки и ферменты ВИЧ, а также происходит дальнейшая сборка вирионов.

Схематично синтез вирусных мРНК в клетке-хозяине можно представить следующим образом:



Геном гепаднавирусов, к которым относится вирус гепатита В (ВГВ), представлен кольцевой молекулой ДНК с недостроенной (+)цепью. После заражения клетки ДНК ВГВ проникает в ядро. Здесь клеточная или вирусная ДНК-полимераза достраивает ДНК ВГВ до полного генома. По матрице вирусной ДНК клеточная РНК-полимераза синтезирует полную РНК-копию генома ВГВ (так называемый *прегеном*), а также ряд мРНК. мРНК перемещаются в цитоплазму и транслируются на рибосомах в вирусные белки. Один из них (фермент полимеразы) обладает функцией обратной транскрипции. В ядре полимеразы на матрице РНК-прегенома выполняет синтез вирусной ДНК.

4. Сборка вирусных частиц происходит в результате специфического взаимодействия вирусных белков и нуклеиновых кислот, которые соединяются электростатическими, гидрофобными и водородными связями. Самосборка простых вирионов основана на способности вирусных белков соединяться в капсомеры, образуя многогранник. В основе самосборки лежит специфическое белок-нуклеиновое и белок-белковое узнавание. Белок-нуклеиновое узнавание ограничено небольшим участком молекулы нуклеиновой кислоты и определяется уникальными последовательностями нуклеотидов в некодирующей части вирусного генома. С этого узнавания участка генома вирусными капсидными белками начинается процесс сборки вирусной частицы. Капсиды с кубическим типом симметрии могут собираться и без присутствия вирусной нуклеиновой кислоты. С другой стороны, вирусы со спиральным типом симметрии формируют нуклеокапсиды только в присутствии нуклеиновой кислоты. Морфогенез сложных вирусов включает также формирование липидной оболочки из клеточных мембран. Обычно это происходит при выходе вируса из клетки.

В связи с разнообразием структуры вирусов разнообразны и способы формирования вирионов, но можно сформулировать следующие общие принципы сборки:

- 1) у простых вирусов формируются провирионы, которые затем в результате модификаций белков превращаются в вирионы.
- 2) у сложноустроенных вирусов сборка осуществляется многоступенчато. Сначала формируются нуклеокапсиды или сердцевин, с которыми взаимодействуют белки наружных оболочек. Этот процесс осуществляется на клеточных мембранах (за исключением сборки вирусов оспы и реовирусов). Сборка ядерных вирусов происходит с участием ядерных мембран, сборка цитоплазматических вирусов – с участием мембран эндоплазматической сети или плазматической мембраны, куда независимо друг от друга прибывают все компоненты вирусной частицы. У некоторых сложных вирусов существуют специальные гидрофобные белки, выполняющие функции посредников между сформированными нуклеокапсидами и вирусными оболочками. Сборка нуклеокапсидов, сердцевин, провирионов и вирионов происходит в специальных структурах, существующих в клетке или индуцированных вирусом (так называемых «фабриках»). Некоторые вирусы для построения своих частиц используют ряд элементов клетки-хозяина.

5. Выход вирусных частиц из клетки может происходить:

- 1) путем «взрыва» с гибелью клетки, что характерно для активно размножающихся простых вирусов, не имеющих суперкапсид (например, пикорнавирусов). Этот процесс происходит быстро;
- 2) путем почкования, что типично для сложных вирусов, имеющих липидную оболочку. У них на заключительном этапе сборки нуклеокапсиды фиксируются на клеточной цитоплазматической мембране. При формировании суперкапсиды происходит ее выпячивание, образуется «почка», которая затем отделяется (примеры – рабдовирусы, орто- и парамиксовирусы). Клетка при этом может сохранять жизнеспособность. Дальнейшая передача вирусов между клетками осуществляется по ходу свободного тока межтканевой жидкости или через прямые межклеточные контакты. Во многих случаях образование таких контактов определяется самим вирусом. Время, необходимое для репродукции, колеблется от 6–8 часов (вирус гриппа) до нескольких суток (вирусы кори, аденовирусы). У ряда вирусов цикл репродукции может быть год и более (цитомегаловирусы, ВИЧ и др.), что ведет к хроническому течению вирусных инфекций.

Весьма часто стандартный цикл репродукции нарушается. В первую очередь, это связано с генетической нестабильностью репликации у вирусов, особенно РНК-содержащих (репликация, склонная к ошибкам). В результате образуются дефектные вирусы, утратившие ряд генов, необходимых для репродукции. Они могут размножаться только при участии вируса-помощника в случае совместной инфекции данными вирусами. Иногда при нарушении сборки вирионов возникают псевдовирусы – частицы, имеющие вирусный капсид, но включающие фрагменты нуклеиновой кислоты клетки хозяина. Псевдовирусы также неспособны к дальнейшей репродукции.

Реализация репродуктивного цикла в существенной степени зависит от типа инфицирования клетки и характера взаимодействия вируса с чувствительной клеткой.

Известны следующие типы взаимодействий «вирус-клетка»:

1. Продуктивная инфекция – завершается успешным образованием вирусного потомства с выходом вирусов и заражением соседних клеток; активная репродукция обычно соответствует острой форме вирусной инфекции.
2. Абортивная инфекция – эффективной репродукции вирусов и образования новых вирионов не происходит, инфекционный процесс прерывается.
3. Персистирующая инфекция (как вариант продуктивной) – репродукция вирусов происходит длительно и постоянно, однако на более низком уровне.

4. Латентная инфекция – вирус постоянно присутствует в клетках, но репродукции вируса не определяется, или она происходит редко (скрытая инфекция).
5. Интегративная инфекция (виrogenия) – происходит встраивание вирусной ДНК в геном клетки-хозяина с образованием провируса (например, у ретровирусов); часто связана с латентной вирусной инфекцией.
6. Трансформирующая инфекция – длительно протекающая вирусная инфекция, которая сопровождается опухолевой трансформацией зараженных клеток (ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты С и В, инфекция папилломавирусом человека).
Персистирующий и латентный варианты характерны для хронической вирусной инфекции, с ее периодами обострения и ремиссии, а также для вирусоносительства.

1.4 Вирусы высших растений

Более 1000 различных болезней растений вызываются «вирусами».

Вирусы растений или фитопатогенные вирусы – это мельчайшие формы субмикроскопических инфекционных агентов (размеры от 20 до 300 нм), не имеющие клеточного строения, а также собственного метаболизма (облигатными внутриклеточными паразитами) и имеющие один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК).

Фитопатогенные вирусы широко распространены в природе. Они поражают самые разнообразные виды растений: дикорастущие и возделываемые, одно- и многолетние, овощные и плодовые культуры, травянистые, кустарники и деревья. Больше всего фитопатогенных вирусов выделено из цветковых растений. Папоротники и голосеменные содержат вирусы редко.

Фитопатогенные вирусы могут вызывать:

- ✓ цветовую пестролистность (у тюльпанов);
- ✓ скручивание, бугристость и другие деформации листьев;
- ✓ локальный и диффузный некрозы;
- ✓ обезображивание плодов;
- ✓ задержку роста растений.

Названия вирусов растений, несмотря на многочисленные попытки придать им латинизированный вид, остаются в основном тривиальными, т. е. образованными при первоначальном выделении и описании вируса, в основном в соответствии с растением-хозяином и внешними симптомами заболевания (например, вирус табачной мозаики, вирус желтой карликовости ячменя и т.п.). При этом закрепляется имя того хозяина, из которого впервые был выделен возбудитель в биоценозах.

1.4.1 Семейства вирусов растений

подавляющее большинство вирусов растений – РНК-содержащие (24 семейства), тем не менее, три семейства вирусов принадлежат к ДНК-содержащим. Большинство из них – вирионы с одноцепочечной линейной цельной молекулой РНК с положительной полярностью. По морфологии их подразделяют на три подгруппы:

- а) бациллярные (около 10 видов), отличающиеся таким же поперечником, как и у рабдовируса желтой карликовости картофеля, имеющего размеры 380×75 нм;
- б) палочковидные (более 30 видов), поперечник которых не превышает 18 нм, а длина варьирует от 300 нм, как у вируса табачной мозаики (ВТМ) и близких ему вирусов: мозаики огурца, кольцевой пятнистой орхидеи, мозаики подорожника и гороха, до 1250 нм, как у вирусов желтой свеклы и пятнистого некроза гвоздики;
- в) изометрические (более 30 видов), в диаметре не превышающие 30 нм, типичными представителями которых являются вирусы мозаики костра, крапчатости коровьего гороха, мозаики огурца, некротической кольцевой пятнистости сливы, кольцевой пятнистости табака, желтухи ячменя, кустистой карликовости томата, желтой мозаики турнепса.

К вирусам с двухцепочечной сегментированной РНК относят вирус раневой опухоли, геном которого состоит из 11 фрагментов, сходные с ним вирусы карликовости кукурузы и риса, сахарного тростника островов Фиджи и измельченности початков кукурузы.

Рассмотрим более подробно некоторые семейства вирусов растений.

I группа включает сем. *Geminiviridae* (*Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocovirus*, *Begomovirus*) и *Nanoviridae* (*Babuvirus*, *Nanovirus*), представители которых поражают двудольные и однодольные растения (кукуруза, фасоль, молочай, маниока, томаты, табак). Вирионы имеют форму икосаэдра (18–20 нм), простой тип организации, геном представлен одноцепочечной кольцевой молекулой ДНК (сегментированной или цельной). Вирусы данной группы вызывают такие заболевания, как ярко-желтая мозаика, желтая мозаика, желтая крапинка, скручивание листьев, задержка роста, полосы, и приводят к снижению урожайности.

II группа включает сем. *Caulimoviridae* (*Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Soymovirus*, *Badnavirus*, *Tungrovirus*), представители которого поражают петунии, банан, ежевику, виноград, рис и табак. Вирионы имеют икосаэдрическую или палочковидную форму (35–50 нм), простой тип организации, геном представлен двухцепочечной линейной или циклической несегментированной молекулой ДНК. Важной особенностью данного семейства является наличие обратной транскрипции в своем репликативном цикле. Вирусы данной группы вызывают такие заболевания, как хлороз листьев, некроз корней, красная полосатость жилок на молодых листьях, маленькие пятнистые стручки и набухание стебля/корня с последующим отмиранием, задержка роста.

III группа включает сем. *Bunyaviridae*, *Ophioviridae*, *Emaravirus*, *Tenuivirus*, *Rhabdoviridae* и *Varicosavirus*, представители которых поражают тюльпаны, голубику, ежевику, рябину, малину, сирень, горох, кукурузу и груши. Вирионы имеют форму спирали (80–400 нм), простой тип организации, геном представлен одноцепочечной молекулой РНК с отрицательной полярностью. Вирусы данной группы вызывают такие заболевания, как хлоротичные полосы на пораженных листьях.

IV группа включает сем. *Endornaviridae*, *Partitiviridae* и *Reoviridae* (*Sedoreovirinae*, *Spinareovirinae*), представители которых поражают свеклу, вишню, клевер, укроп, хмель, люцерну, гвоздику и перец. Вирионы имеют икосаэдрическую форму (25–70 нм), простой тип организации, геном представлен двуцепочечной молекулой РНК. Вирусы данной группы вызывают такие заболевания, как опухоль, карликовость, ржавчина и пожелтение листьев.

V группа включает сем. *Closteroviridae* (*Closterovirus*, *Ampelovirus*), *Crinivirus*, *Potyviridae*, *Bymovirus*, *Tymovirales* (*Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Tymoviridae*), *Benyvirus*, *Secoviridae* (*Sequivirus*, *Waikavirus*, *Comovirinae*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Torradovirus*), *Cilevirus*, *Idaeovirus*, *Luteoviridae* (*Polemovirus*, *Sobemovirus*, *Tombusviridae*), *Ourmiavirus*, *Umbravirus*, *Bromoviridae* (*Alfamovirus*, *Oleavirus*, *Anulavirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*) и *Virgaviridae* (*Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pectovirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*), представители которых поражают чернику, хурму, рис, виноград, горох, цитрусовые, морковь, арахис и табак. Вирионы имеют икосаэдрическую (большинство) или спиралевидную форму (25–350 нм), простой тип организации, геном представлен одноцепочечной молекулой РНК с положительной полярностью. Вирусы данной группы вызывают такие заболевания, как пожелтение, некроз, мозаичная расцветка, просветление жилок и крапчатость.

На сегодняшний день известны несколько способов передачи вирусных инфекций:

1. Семена: через внешнее заражение семян вирусными частицами или заражение через живые ткани зародыша. Передача по этому механизму приводит к ранней вспышке болезней на новых культурах, однако впоследствии заболевания могут быть переданы остальной части урожая другими механизмами.

2. Вегетативное размножение/прививка: эти методы размножения растений недорогие и простые, но предоставляют идеальную возможность для распространения вирусов на новые растения.

3. Переносчики: многие группы живых организмов могут выступать в качестве переносчиков заболеваний и распространять вирусы с одного растения на другое: бактерии (например, *Agrobacterium tumefaciens* – плаزمида Ti этого организма была использована экспериментально для передачи вирусных геномов между растениями), грибы, нематоды, насекомые (например, тли, цикадки, жуки, трипсы), паукообразные (например, клещи).

4. Механический: механическая передача вирусов является наиболее распространенной. Частицы вируса могут загрязнять почву на длительное время и переноситься на листья новых растений-хозяев – в виде переносимой ветром пыли или как грязь, разбрызганная дождем.

1.4.2 Жизненный цикл вирусов растений

Первоначально большинство вирусов растений размножаются в месте заражения, вызывая локализованные симптомы. Накопившись, они медленно распространяются в соседние клетки по межклеточным каналам – плазмодесмам. Впоследствии вирус может распространяться по всем частям растения, либо напрямую от клетки к клетке через сосудистую систему, что приводит к системной инфекции, включающей все растение. Однако проблема, с которой сталкиваются вирусы при заражении – преодоление барьера клеточной стенки растений. Стенки растительных клеток обязательно содержат каналы, называемые «плазмодесмы», которые позволяют клеткам растений общаться друг с другом и передавать метаболиты между собой. Однако эти каналы слишком малы для прохождения вирусных частиц или геномных ядер. Многие вирусы растений (если не большинство) развили специализированные белки движения, которые модифицируют плазмодесмы. Одним из наиболее известных примеров этого является белок Р30 вируса табачной мозаики (ТМВ). Этот белок экспрессируется из субгеномной мРНК, и его функция заключается в модификации плазмодесм, вызывая перенос геномной РНК, покрытой белком Р30, из инфицированной клетки в соседние клетки. Другие вирусы, такие как вирус мозаики коровьего гороха (СРМВ; *Comoviridae*), имеют аналогичную стратегию, но используют другой молекулярный механизм. В СРМВ белки Р58 и Р48 образуют трубчатые структуры, позволяющие интактной вирусной частице проникать из одной ячейки в другую (Рис. 11).

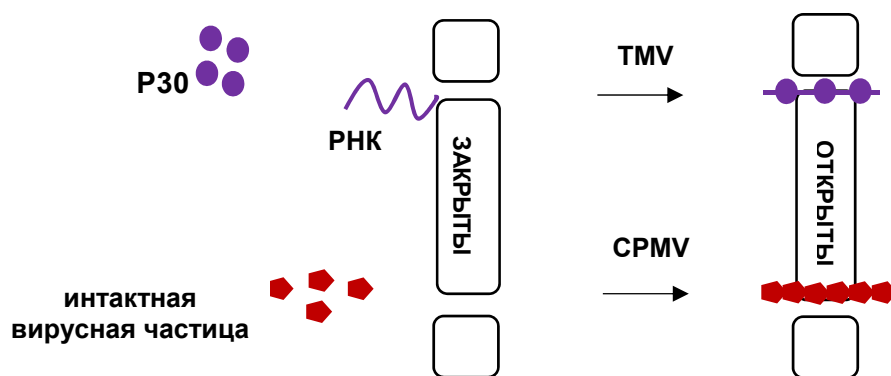


Рис. 11 – Белки движения растений, которые позволяют вирусам растений заражать новые клетки

Перенос вирусов происходит главным образом по флоэме, вместе с током пластических веществ, но возможен и по ксилеме. Как правило, вирусом атакуются активно растущие клетки листа, стебля и корней растений. Так же, как у вирусов позвоночных, репликация фитопатогенных вирионов в клетках происходит вскоре после освобождения их РНК от белковой оболочки. У одних вирусов (вирус табачной мозаики) происходит декапсидирование, а у других (вирус желтой мозаики турнепса) РНК освобождается без разрушения белковой оболочки. Вслед за депротенинизацией в зараженных клетках появляются репликативные и промежуточные формы РНК. Катализируется репликация РНК у фитопатогенных вирусов специфическими полимеразам, но как это происходит в действи-

тельности, до конца не выяснено. Предполагается, что РНК вируса табачной мозаики с молекулярной массой $2,3 \times 10^6$ способна кодировать синтез нескольких белков, в том числе белка оболочки, но *in vitro* он не образуется ни в бесклеточной системе из зародышей пшеницы, ни в ооцитах, которые использовались для изучения его репродукции. Созревание вирусов начинается через 4–5 часов после заражения растений. Первичным местом репликации РНК большинства вирусов растений является ядро, а полное формирование их вирионов завершается в цитоплазме. Детально изучен лишь процесс формирования вирионов мозаичной болезни табака. Он происходит путем самопроизвольной сборки составляющих его компонентов (2130 идентичных молекул белка и однонитчатая РНК). Самосборка капсида начинается с образования дисков, состоящих из 34 субъединиц белка, уложенных в два слоя по 17 субъединиц в каждом, т. е. вирионы ВТМ собираются не из субъединиц белка, а из двухслойных дисков. Диски складываются в нуклеокапсид со спиральным типом симметрии. В дальнейшем в центр включается молекула РНК. У многокомпонентных вирусов, геном которых представлен несколькими, часто неравными фрагментами, как, например, у вирусов мозаики коровьего гороха и люцерны, белки оболочки вначале собираются вокруг каждого фрагмента генома. Оболочка каждого из них может состоять из одного или нескольких типов белков. Как осуществляется их упаковка в один геном, пока достоверно неизвестно. На завершающем этапе репродукции фитопатогенных вирусов у некоторых из них образуются псевдовирионы, содержащие клеточную РНК, в том числе РНК хлоропластов. При большинстве вирусных заболеваний растений зараженные клетки долго продуцируют вирус, не подвергаясь лизису. В этом случае в тканях накапливается огромное количество вирионов. Так, например, в одной клетке волоска листьев табака может содержаться более 10 млн частиц ВТМ. Вирусные инфекции растений могут вызывать такие эффекты, как замедление роста, искажение, мозаичность листьев, пожелтение, увядание и т. д. Эти макроскопические симптомы возникают в результате:

- 1) некроза клеток, вызванного прямым повреждением в процессе репликации вируса;
- 2) гипоплазия – локализованная задержка роста, часто приводящая к мозаицизму (появление более тонких, желтых участков на листьях);
- 3) гиперплазия – чрезмерное деление клеток или рост аномально больших клеток, что приводит к образованию опухших или деформированных участков растения.

Растения можно рассматривать как постоянную мишень для вирусной инфекции, в отличие от животных. Однако растения проявляют сложный диапазон реакций на вирусные инфекции, призванные минимизировать вредное воздействие. Растения борются с вирусными инфекциями несколькими способами. Им необходимо обнаружить инфекцию, что они и делают, считывая молекулы-сигнатуры вируса (так называемые молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами, или РАМР, например, определенные белки) через специальные рецепторы. Когда это происходит, запускается выработка белков устойчивости, которые активируют высокоспецифические механизмы устойчивости. В ответ вирусы растений пытаются уклониться от этих защитных механизмов, изменяя белковые структуры там, где это возможно, и производя белки, которые связываются с малыми РНК и скрывают их, что запускает молчание РНК. Инфекция приводит к «гиперчувствительной реакции», которая проявляется в виде: синтеза ряда новых белков, связанных с патогенезом, увеличения производства фенольных веществ клеточной стенки, высвобождения активных форм кислорода, производства фитоалексинов, накопления салициловой кислоты. Удивительно, но растения могут даже предупредить друг друга, что вирусы передаются воздушно-капельным путем – с такими летучими соединениями, как метилсалицилат. Сверхчувствительный ответ включает синтез широкого спектра различных молекул. Некоторые из этих белков являются протеазами, которые предположительно разрушают белки вируса, ограничивающие распространение инфекции.

Системная устойчивость к вирусной инфекции – это естественное явление. Это явно очень желательная характеристика, которая высоко ценится селекционерами, пытающимися распространить этот атрибут на экономически выгодные ценные сорта сельскохозяйственных культур. Вероятно, задействовано много разных механизмов в системном сопротивлении. Растения производят такие вещества, как протеазы и пероксидазы, для уничтожения вируса, предотвращения его распространения и последующей системной инфекции. Примером этого является ген табака N, который кодирует цитоплазматический белок с нуклеотид-связывающим сайтом. Этот ген вмещается в репликазу TMV. Присутствуя в растениях, этот ген вызывает TMV, для того, чтобы вызвать локализованную некротическую инфекцию, а ненаблюдаемые обычно системные мозаичные симптомы. Устойчивые к вирусам растения были созданы путем производства трансгенных растений, экспрессирующих рекомбинантные вирусные белки или нуклеиновые кислоты, которые препятствуют репликации вирусов. Это очень многообещающая технология, которая дает возможность значительно увеличить сельскохозяйственное производство без использования дорогих, токсичных и экологически вредных химических веществ (удобрения, гербициды или пестициды).

В некоторых странах, особенно в Европе, общественное сопротивление генетически модифицированным растениям до сих пор препятствует широкому распространению новых сортов, полученных посредством генетических манипуляций, без учета экологических издержек неиспользования этих новых подходов к селекции растений.

1.4.3 Вироиды

В зараженных клетках растений отмечены виroidы, которые состоят из одонитевой молекулы РНК. Они представляют собой короткие последовательности, не кодирующие никаких генов (регуляторные элементы), но способные вызывать в зараженных ими клетках образование новых копий, стимулируя транскрипцию каких-то генов. Вироиды были идентифицированы как возбудители опасных болезней. Один из них стал причиной гибели миллионов кокосовых пальм на Филиппинах за последние 50 лет, другой нанес урон промышленному разведению хризантем в США в начале 1950-х гг. Первый виroid – веретеновидности клубней картофеля (или PSTV) – был идентифицирован в 1971 г. Это самый крупный из известных виroidов. Его РНК состоит из 359 нуклеотидов и имеет форму либо замкнутого кольца, либо структуру типа шпильки. Комплементарные пары оснований соединены водородными связями, образуя двунитевую РНК. Вироиды обнаружены только в ядрах инфицированных клеток. Они реплицируются подобно вирусам, т. е. синтезируют комплементарную цепь, которая функционирует как матрица. При этом виroidы используют ферментные системы клетки-хозяина. У растений выявлено 11 заболеваний, которые вызывают виroidы:

- 1) веретенообразность клубней картофеля;
- 2) карликовость хризантем;
- 3) карликовость хмеля;
- 4) карликовость лопуха;
- 5) бледность огурца;
- 6) экзокортис цитрусовых;
- 7) хлоротическую крапчатость вишни;
- 8) солнечные ожоги авакадо;
- 9) кустистость верхушек томатов;
- 10) болезнь плантамоха томатов;
- 11) болезнь Каданга-Каданга кокосовых пальм.

1.4.4 Экономический ущерб от вирусных инфекций

С болезнями растений человечество столкнулось еще в те времена, когда перешло от кочевого скотоводства к оседлому земледелию. На сегодняшний день фитопатогенные вирусы широко распространены в природе. В разных регионах Земли они поражают самые раз-

нообразные виды растений: дикорастущие и возделываемые, одно- и многолетние, овощные и плодовые культуры, травянистые, кустарники и деревья. Существуют вирусы, поражающие примитивные сосудистые, голосеменные и покрытосеменные растения. Вирусы, поражающие сельскохозяйственные растения, наносят значительный экономический ущерб: снижают урожай культур, ухудшают его качество, понижают устойчивость к грибным и бактериальным заболеваниям, а также к абиотическим стрессам; они не позволяют растениям реализовать потенциал урожайности, снижая его, в зависимости от вируса, на 15–20 %, а при таких заболеваниях, как Шарка и реверсия, полностью уничтожают урожай и приводят к гибели насаждений. Пораженные вирусами дикорастущие растения являются постоянным резерватом вирусов и источником их пополнения у сельскохозяйственных культур. По некоторым оценкам, потери от вирусных инфекций достигают 63 млрд долларов США в год.

Основную роль в предотвращении распространения вирусных заболеваний имеют профилактические мероприятия:

1. Внешний карантин – предотвращение ввоза в страну особо патогенных вирусов, объектов внешнего карантина.
2. Внутренний карантин – предупреждение дальнейшего распространения уже имеющих на территории страны вирусов.
3. Создание оздоровительных насаждений.
4. Постоянный мониторинг маточных насаждений.
5. Использование и получение оздоровленного от вирусов посадочного материала.
6. Преиммунизация – искусственное заражение слабоагрессивными штаммами вируса, после чего растения становится менее восприимчивыми к агрессивным штаммам того же вируса.
7. Терапевтические мероприятия: термо- и хемотерапия, метод апикальной меристемы.
8. Селекционный метод – выведение устойчивых сортов.
9. Борьба с переносчиками.
10. Агрохимические мероприятия.
11. Фитопатологический мониторинг диких и одичавших насаждений культур, имеющих общие вирусы с сельскохозяйственными растениями.
12. Организационно-хозяйственные мероприятия – дезинфекция орудий труда, помещений, тары и субстратов для хранения посадочного материала.

1.5 Бактериофаги

Один из составляющих разделов вирусологии посвящен изучению бактериофагов (фагов) (от греч. *phagos* – пожирающий) – группы вирусов, паразитирующих на бактериях. Бактериофаги поначалу вызвали интерес как потенциальное средство борьбы с патогенными бактериями, однако вскоре отошли на задний план, поскольку магистральным направлением вирусологии было изучение вирусов животных. С расцветом генетики в 1940–1960-х гг. они, в первую очередь фаги (колифаги), заняли достойное место в ряду ключевых объектов, на которых проводились исследования основ строения, воспроизведения, передачи и функционирования генов. Позднее, в 1970–1980-х гг., с зарождением, а затем быстрым прогрессом молекулярной биологии бактериофаги стали широко использовать при клонировании генов и анализе их инфраструктуры. Сперва интерес исследователей, прежде всего участников «фаговой группы» в Колд-Спринг Харборе, привлекли бактериофаги T1–T7, размножающиеся в клетках *E. coli*, штамм В, обозначенные как «четные» (T2, T4 и T6) и «нечетные» (T1, T3, T5 и T7). Они различаются по свойствам и объединены в T-серию, согласно хронологической последовательности их выделения. Выбор в качестве модельных объектов именно T-фагов, которые осуществляют литическую инфекцию, на время отвлек внимание исследователей от такого исключительно важного феномена, как вирусная лизогения. Он был открыт в 1921 г. Ж. Борде и подробно изучен на примере фага λ в 1930–1950-х гг. А. Львовым, Ф. Жакобом и Э. Ледербергом.

1.5.1 Классификация бактериофагов

Бактериофаги обладают разнообразным, нередко сложным строением, что позволяет использовать их морфологию в качестве одного из критериев семейства или рода. Напомним, что в 1962 г. А. Львов предложил классифицировать вирусы на основе особенностей морфологии вириона и по типу геномной нуклеиновой кислоты.

В 1967 г. английский вирусолог Д. Брэдли применил этот алгоритм к бактериофагам, подразделив их на шесть основных групп, или морфотипов:

- 1) группа А – dsДНК-фаги с сократимым хвостовым отростком (Т-четные);
- 2) группа В – dsДНК-фаги с длинным несократимым хвостовым отростком (Т1, Т5, λ);
- 3) группа С – dsДНК-фаги с коротким несократимым хвостовым отростком (Т3, Т7);
- 4) группа D – ssДНК-фаги без хвостового отростка, с крупными капсомерами (φX174);
- 5) группа E – ssРНК-фаги без хвостового отростка, с мелкими капсомерами (φ2, R17, MS2);
- 6) группа F – ssДНК-фаги с нитевидным капсидом (M13, fd, f1).

Принадлежность к той или иной группе, по Брэдли, не коррелирует с таким важным признаком, как клеточная специфичность бактериофага. В частности, *Escherichia sp.* инфицируется фагами всех шести групп; *Pseudomonas sp.* – бактериофагами пяти групп (за исключением группы D); *Bacillus sp.* – четырех групп (кроме групп D и F); *Staphylococcus sp.* – только бактериофагами групп А и В.

Классификация, предложенная Брэдли, время от времени применяется до сих пор. Хотя для нетаксономической классификации вирусов в основном используется генетическая система Д. Балтимора, применительно к бактериофагам по-прежнему актуален морфологический критерий. Даже в тех случаях, когда они имеют один тип нуклеиновой кислоты, их относят к разным семействам в соответствии со строением хвостового отростка. Общие критерии рода у бактериофагов не разработаны, и в данном случае эта таксономическая категория носит условный характер.

Внутри рода бактериофаги различаются по кругу хозяев, по чувствительности к абиотическим факторам (температуре, солености и т. д.), по модификации генов (вставки, делеции и т. д.), по вторичной структуре нуклеиновой кислоты (линейная, кольцевая, суперспирализованная и т. д.), а также по инфраструктуре генома. Статус вида получают те штаммы-изоляты, которые инфицируют референтные штаммы бактерий. Когда имеется много штаммов-изолятов, их объединяют в группы по способности инфицировать близкородственных хозяев, и эти группы соответствуют кластерам подобия геномов.

Официально признанные названия видов бактериофагов включают в себя названия хозяев и, как правило, наборы цифр, а также сочетания латинских или греческих букв, отражающие рабочие обозначения штаммов-изолятов. Эти названия пишутся курсивом, например, *Enterobacteriophage P22*. Тривиальные названия бактериофагов, а также их аббревиатуры курсивом не обозначаются, например, фаг χ, фаг P22 и т. д.

В отличие от симптомов вирусной инфекции растений и животных, внешние признаки инфекции у бактериофагов не имеют таксономического значения. За исключением феномена лизогенной конверсии, единственным фенотипическим «проявлением» инфекции служат зоны лизиса или участки угнетения роста на газоне чувствительной бактерии, а также просветление суспензионной культуры, обусловленное лизисом клеток.

Бактериофаги различаются по химической структуре, типу нуклеиновой кислоты, строению фаговой частицы, морфологии негативных колоний, характеру взаимодействия с микробной клеткой:

1. По содержанию нуклеиновых кислот фаги подразделяются на ДНК-содержащие (Т4, φX174, P22, μ) и РНК-содержащие (MS2, Qβ).
2. По способности вызывать инфекцию различают фаги:
 - а) неинфекционные (вегетативные) или незрелые фаги, находящиеся еще в стадии размножения;

- б) инфекционные, т. е. способные вызвать разные формы фаговой инфекции:
- ✓ покоящиеся – фаги, находящиеся вне клетки;
- ✓ вирулентные – фаги, способные вызвать продуктивную форму инфекции;
- ✓ умеренные – фаги, способные вызывать не только продуктивную, но и редуцирующую фаговую инфекцию. Среди умеренных фагов различают фаги с полноценным и дефектным геном.

Умеренные фаги (P1, μ , P22, P4 и λ) характеризуются способностью существовать в состоянии профага, когда фаг вместо репликации обратимо взаимодействует с генетической системой клетки-хозяина, интегрируясь в хромосому или сохраняясь в виде плазмиды (вирусный геном реплицируется синхронно с ДНК хозяина и делением клетки). В состоянии профага литические функции фага подавлены.

Таким образом, типичный бактериофаг может существовать в трех состояниях: профага, вегетативного фага и зрелого фага.

3. По спектру действия на бактерии фаги подразделяются на:
 - а) поливалентные, лизирующие бактерии нескольких видов;
 - б) монофаги, лизирующие бактерии только одного вида;
 - в) типоспецифические фаги, которые избирательно лизируют отдельные варианты бактерий внутри вида. С помощью таких фагов производится наиболее тонкая дифференциация бактерий внутри вида, с разделением их на фаговарианты. Например, с помощью набора фагов Vi-H возбудитель брюшного тифа делится более чем на 100 фаговариантов. Поскольку чувствительность бактерий к фагам является относительно стабильным признаком, связанным наличием соответствующих рецепторов, фаготипирование имеет важное диагностическое и эпидемиологическое значение.
4. Геном фагов заключен в капсид, структурные субъединицы которого уложены по типу:
 - а) спиральной симметрии;
 - б) кубической симметрии;
 - в) двойной симметрии (головка – икосаэдр, хвостик – спиральная симметрия).
5. В зависимости от формы выделяют фаги:
 - а) нитевидные;
 - б) сферические;
 - в) икосаэдрические;
 - г) фаги, имеющие головку и хвостик.
6. В зависимости от размера выделяют фаги:
 - а) мелкие;
 - б) среднего размера;
 - в) крупные.
7. В зависимости от организации строения выделяют фаги:
 - а) простые по строению головчатые и нитевидные фаги содержат одноцепочечную кольцевую ДНК (ϕ X174, f1 и fd) или одноцепочечную линейную РНК (MS-2 и f2);
 - б) сложные фаги состоят из головки и хвостика. Сперматозоидной формы (двойной тип симметрии) фаги состоят из 40–50 % спирально скрученной двуцепочечной ДНК, находящейся в полости головки фага, и 50–60 % белка, из которого построены оболочка головки и отросток фага (колифаги группы T1–T7).

У наиболее изученного сложного фага T2, паразитирующего у *E. coli*, различают следующие структуры: головка – икосаэдр, геном представлен двунитевой линейной ДНК, несущей около 200 генов.

Головка с помощью воротника и зонтика связана с хвостиком, который имеет сложное строение – полый внутри стержень, заканчивающийся шестиугольной пластинкой с шестью шипами. Хвостик имеет белковый чехол, который состоит из 144 субъединиц, образующих 24 витка спирали. Каждая белковая молекула содержит одну молекулу АТФ-азы и ион Ca^{2+} . Белок актиноподобный и способен сокращаться.

В пластинке и шипах содержится лизоцим. Хвостик имеет шесть ворсинок. У неактивного фага они свернуты и сложнoэфирными связями прикреплены к белкам чехла (Рис. 12).

В момент адсорбции ворсинки раскрываются и обеспечивают плотное прикрепление фага к бактериальной клетке. Основное назначение хвостика – обеспечение адсорбции фага на клетке. Если хвостик содержит белковый чехол, последний, благодаря своему сокращению, обеспечивает проникновение стержня через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. Фаг λ (лямбда) также состоит из головки и хвостика. Его геном представлен двунитовой линейной ДНК, имеющей «липкие» концы (избыточные нуклеотидные последовательности на противоположных концах нитей, комплементарные друг другу), поэтому она может переходить в кольцевую структуру, необходимую для ее включения в хромосому клетки-хозяина. ДНК фага λ имеет молекулярную массу около 30 МД, содержит 46 500 нуклеотидных пар и несет 32 гена, 7 из которых кодируют головку, 11 – хвостик, а остальные играют регуляторную роль. Бактериофаги широко распространены в природе и обнаруживаются в воде, почве, сточных водах, организме человека и животных, а также в культурах бактерий. Им присущи все биологические особенности, которые свойственны вирусам. Они устойчивы в пределах рН от 5,0 до 8,0, большинство из них не инактивируется холодными водными растворами глицерина и этилового спирта. На них не действуют такие ферментные яды, как цианид, фторид, динитрофенол, а также хлороформ и фенол. Фаги хорошо сохраняются в запаянных ампулах и в лиофилизированном состоянии, но легко разрушаются при кипячении, действии кислот, химических дезинфектантов, при УФ-облучении.

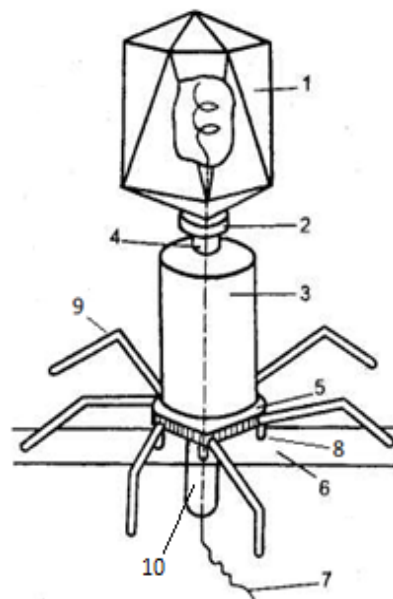


Рис. 12 – Строение бактериофага T2
[Шевцова Л.В., Бачура Ю.М., 2015 г.]:

- 1 – головка (капсид); 2 – «воротничок»;
- 3 – хвост (белковый чехол хвоста); 4 – шейка;
- 5 – базальная пластинка; 6 – оболочка бактерии;
- 7 – фаговая ДНК; 8 – шип; 9 – фибрилла (ворсинка) хвоста; 10 – полый стержень

1.5.2 Жизненный цикл фага

Жизненный цикл фага может проявляться в форме продуктивной, редуکتивной и абортивной инфекций.

1. При продуктивной инфекции фаг размножается в клетке и выходит из нее. Такой формой инфекции обладают вирулентные фаги, в жизненном цикле которых выделяют следующие последовательности:

- а) адсорбция фагов на клеточной поверхности бактерий при помощи специфических рецепторов (белков-лоцманов), которые располагаются на кончике нити, шипа или хвостика. Напомним, что у большинства бактерий в состав клеточной оболочки, помимо цитоплазматической мембраны, входит наружная мембрана, которая обогащена белками (структурные белки, порины, липопротеины). В отличие от цитоплазматической мембраны, липидные слои наружной мембраны асимметричны; внешний полумембранный листок содержит липополисахариды, состоящие из высококонсервативного проксимального липида А, умеренно-консервативного внутреннего домена кор-олигосахарида, умеренно-консервативного внешнего домена кор-олигосахарида и варибельной дистальной или боковой цепи, состоящей из олигосахаридных блоков. Структура наружной боковой цепи определяет специфичность клеточной поверхности грамотрицательных бактерий. Бактериофаги ис-

пользуют в качестве рецептора именно часть наружной боковой цепи (О-антиген). В первую очередь, О-антиген служит рецептором Т-четных фагов. Следует учесть, что у сложноорганизованных вирионов этап адсорбции состоит из нескольких обратимых стадий. Отдельные части вириона (короткие и длинные фибриллы базальной пластинки, белки хвостового отростка и т. д.) последовательно взаимодействуют с разными рецепторами или разными доменами одной и той же рецепторной молекулы. При связывании бактериофага с боковой цепью она разрушается в результате гидролазной активности вирусных белков, что позволяет вириону вступать в прямой контакт с наружной мембраной. С кор-олигосахаридом связываются фаги S13, 6SR, T3, T7 и φX174, в лабораторных условиях – R-мутанты. Эти бактериофаги поражают близкородственные группы, в частности, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* и *Shigella sp.*

Кроме липополисахаридов, рецепторами бактериофагов могут выступать белки, входящие в наружную мембрану. В частности, структурный белок OmpA служит рецептором для трансдуцирующих фагов K3, Oх2 и Tull*. Порины «общего назначения» OmpC и OmpF фильтруют субстраты по размеру. Они служат рецепторами для фагов SS1, TP2, Tu1a и Tu1b, а также фага T4 на стадии необратимой адсорбции. «Специализированные» порины, которые содержат стереоспецифические сайты связывания субстратов, транспортируют молекулы определенных типов, например, моно- и дисахариды, а также нуклеозиды и жирные кислоты. Это индуцибельные белки, и их количество изменяется в зависимости от внешних условий. Фосфопорин PhoE, который накапливается при фосфорном голодании, служит рецептором для фага TC45, фаг T2 рецептируется переносчиком жирных кислот FadL, фаги K10, λ и TP1 связываются с «мальтопорином» LamB, фаги H8, K9, Oх1 и T6 используют в качестве рецепторов канал нуклеозидов Tsx. «Высокоаффинные» порины не образуют постоянно действующих каналов и раскрываются в результате энергозависимого изменения конформации. У грамположительных бактерий отсутствует наружная мембрана, а поверх цитоплазматической мембраны расположен муреин-тейхоатный комплекс.

Тейхоевые кислоты состоят из основной цепи, образованной рибитол-5-фосфатом, глицерол-3-фосфатом или сополимером этих полиолов. По свободным гидроксильным группам к ним присоединяются моносахариды, D- и L-аминокислоты, а также ди-, три- и тетрасахариды, состоящие из остатков глюкозы, N-ацетилглюкозамина, галактозы и N-ацетилгалактозамина. Тейхоевые кислоты высоковариабельны и используются в качестве поверхностных антигенов, а также рецепторов для бактериофагов, специфичных по отношению к серотипу хозяина. «Стеночные» тейхоевые кислоты ковалентно связаны с муреином посредством своего консервативного линкерного домена. Бактериофаги, использующие этот домен в качестве рецептора, способны размножаться в клетках широкого круга хозяев (3C, 52A, 71, 79, 80 и U16).

Не все грамположительные бактерии содержат тейхоевые кислоты, например, они отсутствуют у представителей рода *Micrococcus*. В таком случае бактериофаги адсорбируются на полисахаридной цепи муреина, также точнее, на остатках N-ацетилглюкозамина. На эффективность адсорбции могут влиять дополнительные покровные структуры – полисахаридные капсулы, выполняющие роль К-антигенов. Они служат рецепторами для фага φ63, M1 и некоторых фагов стрептококков. В то же время капсула грамположительных бактерий может препятствовать адсорбции бактериофагов благодаря маскировке рецепторов. Некоторые бактерии, например, *Lactobacillus casei*, не синтезируют тейхоевые кислоты и не образуют капсулу, но зато секретируют экзополисахариды из остатков L-рамнозы, D-глюкозы, D-галактозамина, D-глюкозамина. Остатки L-рамнозы служат рецепторами для фага PL-1. Кофактором служат катионы Ca²⁺ и Mg²⁺, которые иммобилизуются анионным экзополисахаридом. Некоторые бактериофаги используют в качестве рецепторов жгутики, дистальная часть которых состоит из спирально уложенных молекул белка флагеллина, играющего роль Н-антигена. Он служит рецептором лямбдаподобных фагов, которые инфицируют широкий круг энтеробактерий. При адсорбции бактериофага хвостовые фибриллы

облепляют нить жгутика, которая перестает вращаться. Затем бактериофаг по аналогии с закручивающейся гайкой смещается к основанию нити, где он инъецирует свою ДНК. Помимо жгутиков, в роли рецепторов могут выступать фимбрии (пилусы). Ярким примером бактериофага, использующего фимбрию в качестве рецептора, служит фаг $\phi 6$, который инфицирует *Caulobacter vibrioides*, и бактериофаг М6, хозяином которого является *Pseudomonas aeruginosa*. Их вирионы буквально облепляют фимбрию. «Мужской» фаг MS2, инфицирующий *E. coli*, использует в качестве рецептора «половую» F-фимбрию. Для фага PR4 рецепторами служат половые фимбрии *E. coli* и *S. typhi*, вирионы прикрепляются к концу фимбрии с помощью пепломеров, находящихся на вершинах головки.

б) проникновение нуклеиновой кислоты в хозяйскую клетку происходит без капсида и одновременно с этим она через цитоплазматическую мембрану инъецируется в цитоплазму. Из-за сложной структуры оболочки, состоящей из клеточной стенки в комплексе с одной или двумя мембранами (у грамположительных и грамотрицательных бактерий соответственно), проникновение бактериофага происходит в два этапа. На первом этапе вирион или декапсидированная нуклеиновая кислота транслоцируются к цитоплазматической мембране, на втором этапе нуклеиновая кислота поступает в цитоплазму.

Предполагается, что у грамотрицательных бактерий зоной проникновения бактериофага служат связка Байера, т. е. локальные участки, в которых наружная мембрана контактирует с цитоплазматической мембраной. Ригидный слой муреина преодолевается благодаря мурамидазной активности вирусных белков, которые проделывают в нем отверстие, открывая доступ к цитоплазматической мембране. Особый способ – проникновение бактериофагов, которые адсорбируются на поверхности жгутика или фимбрии альтернативного типа. Они инъецируют свою геномную нуклеиновую кислоту в канал, который проходит внутри нити жгутика или нити фимбрии и упирается в цитоплазматическую мембрану. Этот процесс наиболее хорошо изучен у ДНК-содержащих бактериофагов. Осуществляется с помощью двух механизмов, действующих порознь или совместно:

- 1) формирование порового комплекса в цитоплазматической мембране;
- 2) использование энергозависимых транслоказ и протондвижущей силы.

В цитоплазматической мембране клеток *E. coli*, инфицированных фагом T5, обнаружен белок хвостового отростка, формирующий пору диаметром 2 нм. У представителей сем. *Tectiviridae* внутренний липопротеиновый слой капсида выворачивается наизнанку и сливается с цитоплазматической мембраной; ДНК поступает по образовавшемуся каналу. Проникновение фага $\phi 29$ происходит в две стадии: вначале инъецируется 65 %, движущей силой которого служит давление внутри хвостового отростка при изменении конформации его белков, на второй стадии в ход вступают мембраносвязанные белки энергозависимого транспорта (35 % ДНК). Большинство бактериофагов содержат ДНК, что позволяет им участвовать в горизонтальном переносе генов, используя клеточные механизмы. В клетку при заражении таким бактериофагом поступает двунитевая ДНК. Представители сем. *Inoviridae* имеют однонитевую ДНК и при заражении используют механизмы импорта ДНК хозяина. А для фагов сем. *Leviviridae* механизм проникновения до сих пор неизвестен. Попав внутрь клетки, ДНК бактериофага подвергается воздействию рестриктаз, которые подавляют репродукцию бактериофага. При инактивации этих ферментов или при наличии у бактериофага собственной системы модификации его ДНК не рестрицируется, и он беспрепятственно размножается. Подавление активности рестриктаз могут осуществлять белки, расположенные в капсиде бактериофага. Так, например, такие белки есть в капсиде фага P1, T3 и T7. Другой способ защиты ДНК бактериофага – это удаление из нее сайта узнавания для рестриктаз (бактериофаги T3, T7 и $\phi 29$). Третий способ, наиболее распространенный, это пострепликационная модификация оснований, в результате чего рестриктазы не могут распознать сайты узнавания. Последний способ защиты ДНК бактериофага от рестрикции – это метилирование оснований.

- в) все бактериофаги используют системы репликации и транскрипции клетки-хозяина. В этом отношении выделяют группы сильно- (однонитевые бактериофаги MS2 и φX174), средне- (двунитевый бактериофаг λ) и слабозависимых бактериофагов (двунитевый бактериофаг T4).

Геном РНК-содержащих бактериофагов реплицируется с помощью мультисубъединичной РНК-полимеразы. У этого фермента отсутствуют аналоги в живой клетке, и поэтому РНК-бактериофаги содержат кодирующие его гены. С другой стороны, ДНК бактериофага реплицируется с помощью тех же механизмов, которые действуют при репликации бактериальных хромосом, а также при репликации плазмид. При копировании ДНК бактериофага используются либо только клеточные факторы репликации, либо их репликативный комплекс, модифицированный в результате включения в его состав вирусоспецифичных субъединиц. В репликационной вилке ДНК бактериофага образует фаговую реплисому.

Ori-зависимая репликация кольцевой ДНК (тета-механизм)

Кольцевые молекулы хромосомной ДНК клетки-хозяина начинают реплицироваться в сайте *oriC*. В результате взаимодействия этого участка двунитевой ДНК с реплисомой геномная молекула расплетается на нити с образованием двух противоположно направленных репликационных вилок. Опыты с включением ³H-тимидина показали, что на начальном этапе репликативные интермедиаты имеют форму «глазка», а позднее приобретают форму греческой буквы тета (θ). Репликация кольцевых молекул вирусной ДНК и кольцевых плазмид сходна с репликацией кольцевых хромосом. Молекула двунитевой ДНК также расплетается в локусе *ori*, в результате чего образуется репликационный «глазок». Однако копирование осуществляется только в одном направлении, и используется единственная репликационная вилка. Кроме того, в репликации участвует особый инициаторный белок, ген которого находится по соседству с *ориджином*; репликатор также структурно отличается от *oriC*.

Ori-зависимая репликация линейной ДНК

Репликацию линейных молекул вирусной ДНК усложняет то, что полимеразы не могут копировать ее с открытого конца.

Эта проблема решается по-разному:

- линейная ДНК временно переходит в кольцевую форму и реплицируется, как изложено выше;
- на концах ДНК образуются шпильки. Локус *oriC* занимает центральное положение, разделяя хромосому на две «реплихоры» примерно одинаковой длины. Репликация осуществляется в обоих направлениях в соответствии с тета-механизмом. Роль сайтов *terC* выполняют шпильки-теломеры. После копирования ДНК сцепленные кольца теломеров декатенируются с помощью резольвазы, и концы сестринских молекул заделываются одноцепочечными шпильками;
- в качестве праймеров используются не РНК, а белки. Роль *ориджинов* выполняют правый и левый теломеры, а сайт *terC* занимает центральное положение. Инициаторный белок *Тар* распознает сайты *ori*, связывается с ними и начинает расплетать двунитевую ДНК. После этого к свободному 3'-концу ковалентно присоединяется «терминальный» белок *Трг*. Он играет роль праймера и связывается с ДНК-полимеразой, образующей ковалентную связь между ним и первым дезоксирибонуклеозидтрифосфатом, который становится 5'-концевым нуклеотидом. От него дочерние цепи ДНК наращиваются в направлении 5'→3'.

У бактериофагов, содержащих линейную двунитевую ДНК, имеются геномные модификации, которые способствуют формированию репликативных интермедиатов – это:

- концевая избыточность – у T-четных фагов;
- прямые концевые повторы – фаг T7;
- инвертированные концевые повторы – фаг PRD1 и фага μ.

Ori-независимая репликация (сигма-механизм)

Это механизм репликации, известный как «катящееся кольцо». Главная особенность этого механизма заключается в том, что локус *ori* распознается и расплетается специфическими белками; на обеих нитях синтезируются праймеры, и ДНК продолжает расплетаться перед репликационной вилкой. Инициаторный Rep-белок связывается с «двунитевым» ориджином *dso*. Помимо сайта длиной 30 нуклеотидов для связывания, содержит сайт для одностороннего разреза ДНК. Иногда эти сайты примыкают друг к другу. В других случаях их разделяет последовательность протяженностью в 85 нуклеотидов. В результате с Rep-белком ДНК в локусе *dso* изгибается и образует двойную шпильку, что обнажает сайт для одностороннего разреза. Rep-белок наносит разрез в минус-нити ДНК и ковалентно прикрепляется к образовавшемуся 5'-концу при помощи остатка тирозина, расположенного в его активном центре. Одновременно с разрезанием ДНК он привлекает локус *dso*-геликазу, SSB-белки и ДНК-полимеразу Pol III. ДНК в точке разреза начинает наращиваться на 3'-конце с помощью ДНК-полимеразы до тех пор, пока старая ведущая нить полностью не вытиснится новой. Тогда Rep-белок отрезает вытесненную нить в месте соединения старой и новой ведущей нитей. Кольцевая структура восстанавливается при помощи лигазы. Rep-белок освобождается и переходит в неактивную форму. За счет ориджина одноцепочечная нить превращается в двухцепочечную. РНК-полимераза Pol узнает в локусе свой промоторный участок и синтезирует праймер, а ДНК-полимераза Pol III его удлиняет. Завершает репликацию ДНК-полимераза Pol, доращивающая участок, освобожденный после удаления праймера. После этого ДНК-лигаза замыкает концы новой нити. В процессе своего внутриклеточного развития бактериофаги используют генетическую программу, позволяющую переключать транскрипцию с генов одной группы на гены другой группы, причем это происходит в определенной временной последовательности. Поскольку в течение латентного периода транскрипция вирусных генов предшествует репликации геномной нуклеиновой кислоты, ее условно разделяют на две фазы – раннюю (до начала синтеза ДНК) и позднюю (после синтеза ДНК). Гены, транскрибируемые в этих фазах, а также соответствующие белковые продукты подразделяют на ранние и поздние. Поскольку синтез белков из разных групп перекрывается во времени, их дополнительно подразделяют на «предранные», «самые ранние», «запаздывающие ранние», «квазипоздние» и т. д. Самые ранние белки синтезируются в течение двух первых минут инфекции. Как правило, в эту группу входят факторы защиты от рестриктаз и ДНК-полимеразы; их образование полностью обеспечивается бактериальными ферментами. Ранние белки появляются на 2–6-й минуте инфекции и участвуют в регуляции репликации. Поздние белки – белки морфогенеза и лизиса – появляются после 10-й минуты. Для включения транскрипции очередной группы генов или выключения транскрипции генов предыдущей группы используются разнообразные механизмы: контроль промоторов, смена сигма-факторов, привлечение фаговых терминаторов и антитерминаторов и т. д.

г) сборка и освобождение вирионов происходит после завершения репликации фагового генома.

Известны два способа сборки бактериофагов:

- 1) сборка предшественников капсида (прокапсида) с последующей упаковкой в него геномной нуклеиновой кислоты (сем. *Cystoviridae* и *Microviridae*);
- 2) коагрегация генома и структурных белков (сем. *Inoviridae* и *Leviviridae*).

В первом случае прокапсид образуется с помощью «морфогенетических» белков, которые кодируются как фаговым, так и клеточным геномом. При сборке икосаэдрических прокапсидов эти белки образуют внутренний и наружный каркас. У разных бактериофагов структура внутреннего каркаса различается: у фага икосаэдрический каркас – внутри строящегося прокапсида; у фага P22 элементы икосаэдрической симметрии каркаса наблюдаются только в участках его контакта с капсомерами; у большинства двухцепочечных фагов белки каркаса не образуют икосаэдрическую структуру, а в виде моно-, ди- и тетрамеров присоединяются к капсомерам. Прокапсид фага φX174 состоит из структурного белка (60 копий), пепломерного белка (60 копий), белка внутреннего каркаса (60 копий) и белка наружного каркаса (240 копий).

Наружный каркас обеспечивает взаимодействие между пепломерами и капсомерами, а также контролирует икосаэдрическую укладку последних. Внутренний каркас индуцирует конформационные изменения капсомеров, что инициирует их самосборку. Белки каркаса обеспечивают минимальный уровень конденсации структурных белков, достаточный для начала самосборки капсида, форма и размер которого определяются строением капсомеров, в конечном счете. Поскольку этот процесс может происходить по-разному и приводить к разным результатам, основная задача морфогенетических белков – регулировать сборку в правильном направлении. Сказанное демонстрируют фаг Р2 и его вирус-сателлит Р4. Белки каркаса также контролируют образование входного отверстия для упаковки генома, или портала. Как правило, совместно с белками каркаса они инициируют сборку капсида. Перед упаковкой генома внутренний каркас удаляется из прокапсида, однако у фага Р22 его мономеры сохраняются и могут повторно использоваться для сборки еще нескольких вирионов. У представителей сем. *Microviridae* внутренний каркас также удаляется без участия протеаз; решающую роль играет конкуренция между ним и ДНК за сайты связывания структурных белков. Геномная нуклеиновая кислота бактериофагов проникает в прокапсид через кольцевой портал на одной из его вершин. Этот портал состоит из 12 субъединиц с центральным каналом (Рис. 13).

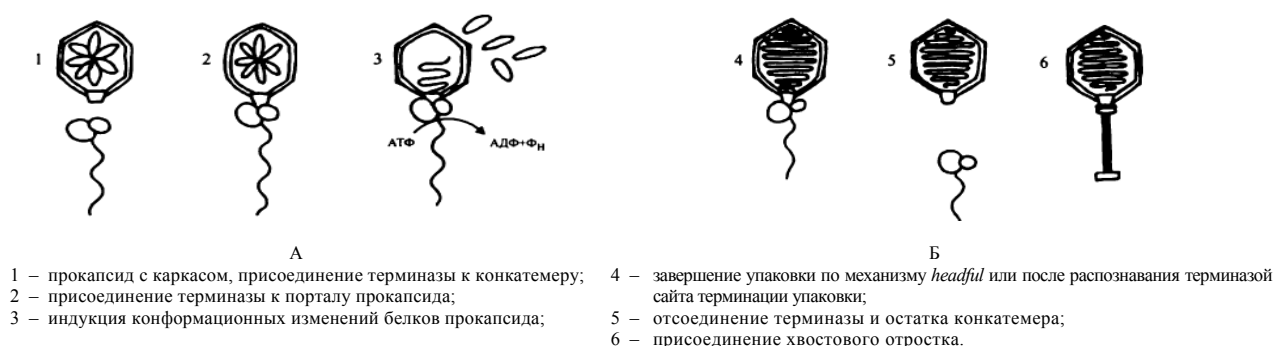


Рис. 13 – Упаковка ДНК бактериофага и сборка вириона
[Пиневич А. В. [и др.], 2012 г.]

Образование сложных вирионов включает в себя несколько независимых актов: помимо сборки прокапсида и упаковки нуклеиновой кислоты идет сборка хвостового отростка и концевых фибрилл. Из этих частей окончательно собирается зрелый вирион. Второй, реже встречающийся механизм упаковки, – коагрегация геномной нуклеиновой кислоты и структурных белков – обеспечивается их сайтспецифичными взаимодействиями. В данном случае сборка и упаковка происходит одновременно, без промежуточных стадий или интермедиатов. Такой механизм характерен для одноцепочечных бактериофагов – независимо от их хозяйской принадлежности и формы вириона. У бактериофагов очень распространен литический инфекционный цикл, когда выход вирионов сопряжен с разрушением клетки-хозяина. В большинстве случаев лизис обеспечивается двухкомпонентной ферментной системой, состоящей из лизина (эндолизина) и холина. Эндолизины: гликозилазы и трансгликозилазы разрушают гликозидные связи в полиглицановом остове муреина; амидазы и эндопептидазы воздействуют на пептидные связи в поперечных мостиках. Холины являются гидрофобными интегральными мембранными белками, они повышают проницаемость цитоплазматической мембраны и открывают эндолизинам доступ к пептидогликану. Их подразделяют на классы:

- I – белки с тремя трансмембранными спиралями, состоящие из >95 аминокислот;
- II – белки с двумя трансмембранными спиралями, состоящие из 65–95 аминокислот.

В систему лизиса клетки-хозяина дополнительно входят регуляторные белки, которые активируют или ингибируют активность холинов. При инфицировании вирулентными штаммами фагов из сем. *Leviviridae* и *Microviridae* лизис клеток осуществляется амуринами, которые блокируют отдельные стадии биосинтеза пептидогликана. При таком сценарии лизиса хозяин сохраняет жизнеспособность до заключительных этапов инфекции.

2. При редуکتивной инфекции геном фага проникает в клетку, однако размножения фага не происходит, его геном интегрируется в хромосому клетки-хозяина, становясь ее составной частью (лизогенный сценарий).

Интеграция – процесс встраивания генома бактериофага в хозяйскую клетку. Осуществляется этот процесс с помощью вирусной интегразы. Геномная ДНК бактериофага, встроенная в хромосому и образующая с ней единый репликон, называется профагом. Бактерия, в хромосому которой встроен профаг, называется лизогенной. Бактериофаги, способные вызывать лизогению, называются умеренными, в отличие от вирулентных, или литических бактериофагов, размножение которых чаще всего приводит к лизису клетки-хозяина. Лизогенная инфекция приобретает либо хронический характер, либо временный. Во втором случае происходит индукция профага; он удаляется из клеточной хромосомы и начинает размножаться по литическому сценарию. Рассмотрим более подробно механизм интеграции и эксцизии фага λ , инфицирующего клетки *E. coli*. Фаг состоит из головки и хвостика. Его геном представлен двунитевой линейной молекулой ДНК, имеющей «липкие» концы (избыточные нуклеотидные последовательности на противоположных концах нитей, комплементарные друг другу), поэтому она может переходить в кольцевую структуру, необходимую для ее включения в хромосому клетки-хозяина. ДНК фага λ имеет молекулярную массу около 30 МД, содержит 46 500 нуклеотидных пар и несет 32 гена, 7 из которых кодируют головку, 11 – хвостик, а остальные играют регуляторную роль. Фаг λ включается в хромосому *E. coli* между генами *gal* и *bio* с помощью сайт-специфической рекомбинации. Она оказывается возможной потому, что ДНК фага имеет особый участок – *attP* (от англ. *attachment phage* – прикрепление фага). Такой же участок имеется и в хромосоме *E. coli* – *attB*. Он расположен между генами *gal* и *bio*. Участки *att* имеют сложную структуру и состоят из 250 нуклеотидов. В результате рекомбинации между *attP* и *attB*, протекающей по механизму кроссинговера, фаговая ДНК оказывается включенной в хромосому, причем слева она фланкирована участком *attL* (от англ. *left* – левый), а справа – *attR* (от англ. *right* – правый), которые образуются вследствие рекомбинации между *attP* и *attB*. Рекомбинация протекает с участием генов *red* фага и *hesA* – бактерии. Для интеграции требуется также белок фага – продукт гена *int* (интегразы) и особый хозяйский белок интеграции. Таким образом, геном фага, интегрируясь в хромосому, превращается в профаг, а клетка становится лизогенной. Выходу профага из хромосомы препятствует цитоплазматический репрессор, который наделяет клетку одновременно иммунитетом против повторного инфицирования данным фагом. Синтез репрессора контролируется фагом. Однако профаг спонтанно или под воздействием различных факторов (химические вещества, облучение УФ, рентгеновскими лучами, повышенная температура) может выходить из хромосомы клетки и вызывать продуктивную инфекцию, заканчивающуюся лизисом клетки и выходом из нее вновь синтезированных вирионов (Рис. 14). Механизм выхода (исключение фага) из хромосомы состоит в том, что происходит ре-

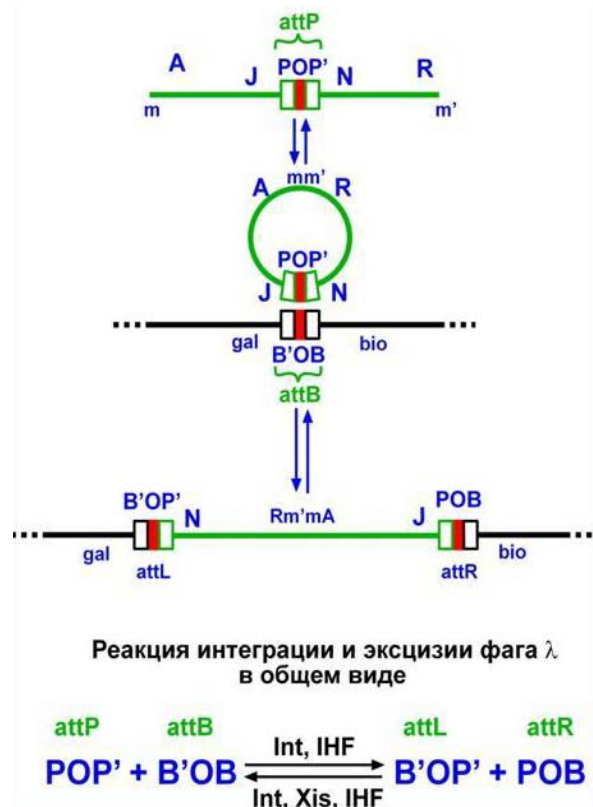


Рис. 14 – Механизм интеграции и эксцизии фаговой ДНК на примере фага λ [http://www.myshared.ru/slide/647682/]

комбинация между attL и attR, в результате которой восстанавливаются attP и attB, а фаговая ДНК принимает кольцевидную структуру и исключается из хромосомы. Процесс выхода требует участия, помимо указанных выше белков, еще одного белка – продукта фагового гена xis (ген эксцизии, исключения). Связь профага с бактерией очень прочная и в естественных условиях нарушается с частотой 10^{-2} – 10^{-3} (спонтанная продукция фага). Частоту отщепления профага от бактериальной хромосомы можно увеличить, воздействуя на лизогенные бактерии ультрафиолетовыми лучами, ионизирующей радиацией и химическими мутагенами (индукция лизогенных бактерий). В результате интеграции профага бактерии могут приобретать новые фенотипические свойства. Этот процесс получил название «лизогенная», или «фаговая конверсия». Признаки лизогенной конверсии разнообразны: изменения морфологии и пигментации колоний, смена серотипа. Поскольку при лизогенной конверсии может измениться состав вирусных рецепторов, лизогенные бактерии приобретают «иммунность», или устойчивость к заражению родственными бактериофагами.

3. При abortивной инфекции взаимодействие фага с клеткой обрывается на какой-то стадии жизненного цикла фага, и он погибает.

1.5.3 Обнаружение бактериофагов и их практическое применение

Основные методические приемы при выявлении бактериофагов, определении их активности и подсчете фаговых частиц основаны на способности фагов вызывать лизис бактериальных клеток при выращивании в жидких или твердых питательных средах. Бактериофаг, добавленный к суспензии бактерий, после заражения и образования потомства приводит к просветлению бактериальной культуры, либо, в случае полного лизиса клеток, среда становится совершенно прозрачной. В некоторых случаях после отмеченного лизиса культуры может наблюдаться вторичный ее рост за счет размножения имеющихся в популяции фагорезистентных клеток. Размножение бактериофага и, соответственно, лизис клеток чувствительной культуры на поверхности агаризованной питательной среды проявляется в том, что в месте нанесения суспензии фага рост бактерий отсутствует. Лизис культуры за счет развития бактериофага на бактериальном газоне приводит к образованию округлых прозрачных участков, называемых стерильными пятнами, фаговыми бляшками или негативными колониями фага, которые хорошо заметны при просмотре чашек в проходящем свете. Размер и форма негативных колоний являются важной характеристикой фага, например, у дизентерийных бактериофагов негативные колонии имеют звездчатую форму.

Однако морфология негативных колоний может варьировать в зависимости от условий культивирования (плотности и состава среды, температуры культивирования и др.), поэтому изучение и описание данного свойства проводят в строго стандартных условиях. По величине негативные колонии подразделяются на крупные, средние, мелкие и точечные. Диаметр

образующихся колоний пропорционален скорости репродукции фага, скорости освобождения фаговых частиц из клеток и их адсорбции на поверхности неинфицированных бактериальных клеток и может быть пропорционален размеру фаговых частиц, который определяет скорость их диффузии в агаре. Следовательно, крупные фаги образуют мелкие негативные колонии, фаги с небольшим размером вирусной частицы – крупные негативные колонии. Морфология негативной колонии относится к признакам, чрезвычайно специфичным для данного фага, иногда для группы родственных фагов. Фаговые бляшки могут быть прозрачными или выглядеть мутными. Мутные бляшки обычно образуют умеренные бактериофаги, поскольку большинство бактериальных клеток внутри бляшки остаются лизогенными. Стерильное пятно может быть окружено одной или несколькими зонами неполного лизиса, имеющими вид окружностей различной ширины. Иногда негативные колонии опалесцируют, что обусловлено рассеянием света большим количеством фаговых частиц в негативной колонии. Сформировавшаяся негативная колония содержит 10^6 – 10^9 фаговых частиц.

Размножение бактериофага в популяции бактерий представляет собой совокупность множества отдельных идентичных друг другу инфекционных процессов в изолированных бактериальных клетках. Взаимодействие каждой частицы фага с бактериальной клеткой характеризуется определенной протяженностью внутриклеточного периода развития – так называемого латентного периода.

Латентный период – это минимальный промежуток времени с момента адсорбции фага до лизиса клетки. Первая половина латентного периода, во время которой еще не удается обнаружить в зараженной клетке инфекционный фаг, называется скрытым периодом. Каждая система «фаг – бактерия» в стандартных условиях проведения опыта характеризуется определенными величинами латентного и скрытого периодов. Второй важной характеристикой взаимодействия фага с клеткой бактерии является выход («урожай») фага – среднее количество частиц бактериофага, освобождаемых клеткой в момент лизиса. Можно также рассчитать средний выход фага – отношение общего количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага к числу первоначально зараженных бактерий.

Вышеперечисленные характеристики, присущие системе «фаг – бактерия», можно определить в опыте по изучению одиночного цикла развития бактериофага (ОЦР), предложенного Е. Эллисом и М. Дельбрюком в 1939 г. Этот эксперимент является одним из классических методов для изучения вирусов бактерий. В опыте по изучению ОЦР культуру чувствительных к данному фагу бактерий инфицируют частицами бактериофага в таком количестве, чтобы обеспечить заражение только 10 % клеток (множественность 12 инфекции составит 0,1). Так как адсорбция частиц фага на клетках бактерий происходит в результате их случайных столкновений, то при указанном их соотношении большинство клеток будет адсорбировать только по одной фаговой частице. После непродолжительного периода (около 5 минут), в течение которого адсорбируется основное количество частиц бактериофага, весь неадсорбированный фаг нейтрализуют антифаговой сывороткой. Для того чтобы полностью исключить адсорбцию фага на бактериальных клетках, дополнительно разводят инфицированную культуру для уменьшения концентрации фаговых частиц и клеток бактерий и сведения скорости адсорбции до минимума. После этого через определенные промежутки времени в течение 20–40 минут отбирают пробы и испытывают на наличие фага методом агаровых слоев. Подсчет числа негативных колоний на следующий день эксперимента показывает, что на чашках, засеянных инфекционной смесью, взятой на протяжении определенного периода времени после начала заражения суспензии бактерий фагом, число негативных колоний будет оставаться постоянным во всех пробах. Это время и будет представлять собой латентный период размножения бактериофага. Стерильные пятна, образованные на чашках, засеянных в этот период, возникли не из свободных фаговых частиц, которые к этому времени уже были связаны антифаговой сывороткой, а явились результатом завершения одиночного цикла размножения бактериофага в зараженных клетках уже после высева пробы. После завершения латентного периода наступает лизис клеток бактерий и в жидкую культуральную среду начинает выходить многочисленное фаговое потомство. Поэтому в пробах, взятых после завершения латентного периода и засеянных на чашки, обнаруживается внезапное увеличение количества стерильных пятен. Их количество возрастает в течение некоторого времени, иногда называемого периодом выхода фага, или периодом лизиса, до тех пор, пока все инфицированные клетки не лизируются. После этого на чашках опять обнаруживается постоянное количество негативных колоний, которое соответствует общему количеству фагов, освобожденных при лизисе всех зараженных клеток, и отражает установление нового (конечного) титра фага.

Бактериофаги используются:

- для идентификации микроорганизмов, в том числе и для диагностики инфекционных заболеваний (в фагодиагностике – методе косвенной диагностики инфекционных заболеваний, заключающемся в выделении специфического фага из организма больного);

- для выявления бактериального загрязнения (в фагоиндикации, когда присутствие фага рассматривают как косвенный показатель загрязненности исследуемого материала);
- для профилактики некоторых инфекционных заболеваний (в фагопрофилактике – методе предупреждения некоторых кишечных инфекционных заболеваний (бактериальной дизентерии, холеры, сальмонеллеза и др.) с помощью препаратов бактериофагов);
- для лечения некоторых инфекционных болезней (в фаготерапии – методе лечения некоторых инфекций с помощью препаратов бактериофагов).

Фагодиагностику бактерий осуществляют путем постановки пробы на фаголизис в жидкой или плотной питательной среде. Методы фагодиагностики используют главным образом при работе с возбудителями 14 кишечных и особо опасных инфекций (дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллез, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза). Колифаги являются адекватными индикаторами загрязнения воды коли-бактериями, на которых они паразитируют, а также другими кишечными вирусами, поскольку и колифаги, и кишечные вирусы имеют общий источник поступления в окружающую среду. Показатель наличия колифагов можно использовать для оценки эффективности процессов очистки воды от вирусного загрязнения. Препараты бактериофагов выпускают в виде таблеток, мазей, аэрозолей, свечей и суспензий. Употребляют препараты для орошения полостей, смазывания раневых поверхностей, вводя перорально, внутривенно и т. п. Широкое применение нашли следующие лечебно-профилактические культуры бактериофагов: стафилококковый, стрептококковый, дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный, колифаг, протейный, синегнойный; для снижения частоты бактериальных осложнений у больных используется также пиобактериофаг; имеются комбинированные препараты, используемые при кишечных инфекциях, инфекциях стрептококковой и стафилококковой этиологии, ожогах и травмах, осложненных гнойным воспалением и др.

Одним из преимуществ препаратов бактериофагов является высокая специфичность их действия в отношении штаммов-хозяев. Кроме того, препараты бактериофагов нетоксичны, не вызывают развития дисбактериозов и аллергических реакций. Бактериофаги могут применяться вместе с антибиотиками и иммунопрепаратами. В молекулярной биологии бактериофаги используют в качестве относительно простой биологической системы и удобной экспериментальной модели при исследовании взаимоотношений вируса и клетки, а также закономерностей основных молекулярных процессов в клетке. Значительные успехи современной биологии в изучении механизмов репликации нуклеиновых кислот, возникновении мутаций, регуляции процессов транскрипции и трансляции были достигнуты именно с применением бактериофагов в качестве модельных объектов. Бактериофаги могут быть использованы в качестве метки в диагностических иммунологических наборах наравне с радиоактивной, флуоресцентной и ферментной метками. В случае образования комплекса антигена с антителом присоединенный к антигену бактериофаг будет инактивироваться, и негативные колонии на культуре чувствительных бактерий образовываться не будут. В последние годы сконструированы библиотеки генов переменных областей иммуноглобулина человека, находящихся в составе рекомбинантных бактериофагов нитевидной формы (например, M13, fd). Внедрение фрагментов чужеродной ДНК, кодирующих короткие пептиды в 5'-кодирующую область гена III белка оболочки фага M13, приводит к появлению фаговых частиц, на конце которых «выставлены» посторонние для них пептиды или белки (в данном случае иммуноглобулины). Благодаря этой технологии можно отбирать высокоаффинные антитела к любому данному антигену.

1.6 Патогенные вирусы животных и человека

Специфика вирусов животных тесно связана с особенностями строения и физиологии их хозяев, поскольку является результатом их совместной эволюции. Вирусы животных проникают в клетки либо путем эндоцитоза, либо в результате слияния оболочки

вириона с цитоплазматической мембраной. Так, например, вирус гриппа использует механизм клатрин-опосредованного, а полиомавирусы – кавеолин-опосредованного эндоцитоза; вирусы герпеса, вирус иммунодефицита человека и вирус кори доставляют свой генетический материал в цитоплазму хозяина путем слияния липопротеиновой мембраны вириона с цитоплазматической мембраной. Таким образом, в отличие от бактериофагов, вирусы животных проникают в клетку либо в интактном виде, либо частично раздетыми. Поскольку у млекопитающих сильно развит клеточный и гуморальный иммунитет, их вирусы часто содержат гены, ответственные за уклонение от иммунного ответа хозяина или за его подавление. Так, например, в геноме аденовирусов присутствует блок стелс-генов, продукты которых вызывают деградацию поверхностных рецепторов зараженной клетки, в результате чего она становится «невидимой» для иммунной системы; вирусы гриппа и кори кодируют ранние неструктурные белки, подавляющие клеточный сигналинг, в частности, при использовании системы интерферона, предназначенной информировать соседние клетки о вирусной инфекции и запускать противовирусный ответ; вирус Эбола и респираторно-синцитиальный вирус (RSV) не только блокируют межклеточный сигналинг, но и заставляют инфицированные клетки секретировать вирусные белки для связывания нейтрализующих антител, которые вырабатываются в ответ на вирусную инфекцию.

1.6.1 Цикл развития вирусов животных и человека

Цикл развития вирусов животных состоит из тех же основных стадий, что и у вирусов других организмов, однако имеет ряд особенностей.

1. Адсорбция. Для того чтобы вирус прикрепился к клетке, на ее поверхности должны присутствовать рецепторы с той или иной степенью избирательности; соответственно, различают неспецифическую и специфическую адсорбцию. В неспецифической адсорбции участвуют неполярные и полярные химические группы, широко представленные на поверхности клеток разного типа, в частности, остатки сахаров, сиаловая кислота, гепарансульфат, заряженные «головки» липидов и т. п. Неспецифическая адсорбция не всегда завершается проникновением вируса и бывает обратимой. Однако когда вирион вступает во взаимодействие со специфическими рецепторами, она становится необратимой. Специфическая адсорбция – это сложный многостадийный процесс, в котором могут участвовать несколько вирусных и клеточных белков. Как правило, со стороны хозяина она опосредована сложноустроенными рецепторами, характерными для определенного типа клеток. Например, рецептором для вируса ВИЧ являются молекулы CD4 (трансмембранные белки, экспонированные на поверхности Т-хелперов). Для аденовирусов первичным специфическим рецептором служит белок CAR; на следующей стадии специфической адсорбции используются интегрины (белки, обеспечивающие прикрепление клетки к внеклеточному матриксу). Вслед за специфической адсорбцией происходит интернализация вирусного генома.
2. Проникновение вируса. Вирусы животных проникают в клетки либо путем эндоцитоза, либо в результате слияния суперкапсида с цитоплазматической мембраной. Эндоцитоз происходит в ответ на лиганд-рецепторное взаимодействие клетки с вирусными белками. В данном случае вирус использует механизмы, которые в норме обеспечивают поглощение пищи и/или обновление поверхностных рецепторов. Многие оболочные вирусы проникают в клетки путем слияния вирусной мембраны с мембраной хозяина; для этого используются специализированные вирусные белки слияния. Примером служат представители сем. *Paramyxoviridae*, в частности, вирусы кори, парагриппа, чумы плотоядных и эпидемического паротита (свинки), а также представители сем. *Retroviridae* – вирусы иммунодефицита и лейкозов.
3. Раздевание вируса и презентация генома. У вирусов животных, использующих для проникновения в клетки механизм слияния мембран, презентация генома обычно сопряжена с проникновением. Если вирус заражает клетку путем эндоцитоза, про-

никновение предшествует презентации генома. Для этого мембрана оболочных вирусов (таких, как вирус гриппа) сливается с мембраной эндосомы; безоболочные вирусы (например, пикорнавирусы) прикрепляются изнутри к мембране эндосомы, их капсиды раскрываются, высвобождая геномную РНК. Нуклеокапсиды ДНК-содержащих вирусов (в частности, аденовирусов и вирусов герпеса) доставляются к ядерным порам, и геномная нуклеиновая кислота высвобождается в нуклеоплазму. Внутриклеточная транслочация нуклеокапсидов или рибонуклеопротеиновых комплексов происходит с помощью транспортных белков, которые распознают специфические сайты на вирусных белках, например, сигналы ядерной локализации. Следует отметить, что не все вирусы животных проходят стадию раздевания. Например, содержащие двуцепочечные РНК ротавирусы никогда полностью не раздеваются и не высвобождают свой геном – у них первичная транскрипция происходит внутри капсида; геномы потомства также образуются не в цитоплазме, а внутри заранее сформированных капсидов.

4. Синтез вирусных белков и нуклеиновых кислот. Различают ранние и поздние вирусные белки; первые образуются в начале цикла размножения, вторые – в конце его. Многие вирусы животных на ранней стадии инфекции синтезируют специализированные белки, подавляющие иммунный ответ хозяина. Как правило, это неструктурные белки, которые не входят в состав вирусных частиц. Вирусы животных различаются по зависимости от клеточных биосинтезов. В то время как их белки, как у всех вирусов, образуются на хозяйских рибосомах, их нуклеиновые кислоты обычно синтезируются собственными ферментами. Для этого РНК-содержащие вирусы (в частности, вирус гриппа) используют вирусоспецифичные РНК-зависимые РНК-полимеразы. Крупные ДНК-содержащие вирусы (например, вирусы африканской чумы свиней, иридовирусы и вирусы оспы) образуют цитоплазматические вирусные фабрики, где геномная ДНК синтезируется с помощью вирусных ферментов.
5. Сборка вирионов. После того как в клетке накопилось достаточно вирусных структурных белков, начинается сборка вирионов. У большинства ДНК-содержащих вирусов животных сначала формируются капсиды, а затем в них упаковывается генетический материал. Вирионы оболочных РНК-содержащих вирусов упаковываются и при отпочковании от клеточных мембран.
6. Выход вирионов. Безоболочные вирусы животных часто образуют внутри инфицированной клетки обширные квазикристаллические скопления. В данном случае вирионы могут выйти из клетки только после того, как цитоплазматическая мембрана разрушится и клетка погибнет. Некоторые вирусы, например, аденовирусы, помогают выходу своего потомства, образуя «белки смерти», или апоптены, которые стимулируют апоптоз. Выход оболочных вирусов, в отличие от выхода безоболочных вирусов, обязательно связан с гибелью клетки. При низкой интенсивности отпочкования, например, при хронической инфекции вирусом гепатита С, клетка может долго существовать, производя все новые и новые вирусные частицы. У многих оболочных вирусов (в частности, у вирусов гриппа и коронавируса) представители нового поколения вирионов остаются после выхода прикрепленными к клеточной мембране; чтобы нарушить эту связь, требуются специализированные вирусные или клеточные ферменты. У вируса гриппа такую роль выполняет нейраминидаза. Многие вирусы циркулируют в природных популяциях хозяев, не причиняя им особого вреда (специфичность вируса.) В то же время у «тупикового» хозяина, каковым часто является человек, вирусы животных способны вызывать тяжелые, а иногда смертельные заболевания (в популяции тупикового хозяина вирус по определению не передается от особи к особи). Примерами служат вирусы бешенства и клещевого энцефалита. Для многих вирусов животных характерен сложный экологический цикл, обусловленный свойством размножаться в клетках неродственных организмов, например, млекопитающих и членистоногих. Очень часто промежуточными хозяевами служат членистоногие

(клещи, москиты и т. д.), поэтому вирусы, которые передаются млекопитающим через их укус, называются арбовирусами. Следует учесть, что специфичность вирусов никогда не бывает абсолютной и варьирует в широких пределах в зависимости от природы вируса и хозяина. Например, чума плотоядных, поражающая главным образом собак и волков, не раз становилась причиной гибели львов и леопардов в африканских национальных парках. Когда вирус встречается с популяцией нового хозяина и приобретает способность передаваться от особи к особи, говорят о преодолении вирусом межвидового барьера и о смене хозяина. Примером служит появление в 1976 г. новой болезни собак – парвовирусного энтерита («олимпийки»). Этот новый парвовирус – вариант давно известного вируса панлейкопении кошек, который при невыясненных обстоятельствах сменил хозяина и в результате перестал быть патогенным для первичного хозяина, хотя сохранил способность в нем размножаться.

1.6.2 Клеточный тропизм

В многоклеточном организме вирус заражает только клетки, на поверхности которых имеются специфические рецепторы и которые способны поддерживать его размножение.

Например, ротавирусы и парвовирусы поражают тонкий кишечник, вызывая острый энтерит, однако первые размножаются исключительно в дифференцированных клетках ворсинок, а вторые – в камбиальных клетках крипт.

Респираторные вирусы, как правило, могут размножаться только в эпителии дыхательных путей, а вирусы, вызывающие гепатит, – в гепатоцитах. Некоторые вирусы способны размножаться в клетках нескольких типов. Например, вирус простого герпеса при первичном заражении размножается в эпидермисе, а затем по аксонам добирается до спинальных ганглиев, где вызывает латентную инфекцию. В свою очередь, вирус полиомиелита в норме реплицируется в желудочно-кишечном тракте, однако в провоцирующих условиях (при травмах, внутримышечных инъекциях и т. д.) может проникнуть в центральную нервную систему и вызвать поражение моторных нейронов.

Многие вирусы способны изменять свой клеточный тропизм при прогрессирующей инфекции. Например, вирус иммунодефицита человека в начальной стадии инфицирует почти исключительно Т-хелперы, однако с развитием заболевания приобретает способность заражать моноциты/макрофаги, дендритные клетки и астроглию.

Наконец, коронавирусы кошек в норме персистируют в эпителии кишечника, однако если хозяин перенес стресс, они начинают заражать макрофаги, а затем клетки других тканей и органов. Развивается системная инфекция, заканчивающаяся гибелью.

1.6.3 Разнообразие вирусов животных и человека

Современная систематика вирусов учитывает, в первую очередь, тип геномной нуклеиновой кислоты и, как следствие, стратегию ее транскрипции и репликации.

Согласно классификации Д. Балтимора, можно выделить семь основных групп вирусов животных и человека, на которых мы остановимся подробнее:

- 1) одноцепочечные РНК-вирусы положительной полярности – вирусы сем. *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae* и *Togaviridae*;
- 2) одноцепочечные РНК-вирусы отрицательной полярности – вирусы сем. *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*;
- 3) двуцепочечные РНК-вирусы – вирусы сем. *Birnaviridae* и *Reoviridae*;
- 4) одноцепочечные ДНК-вирусы – вирусы сем. *Circoviridae* и *Parvoviridae*;
- 5) двуцепочечные ДНК-вирусы – вирусы сем. *Adenoviridae*, *Asfarviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae* и *Papillomaviridae*;
- 6) одноцепочечные РНК-ретровирусы – вирусы сем. *Retroviridae*;
- 7) двуцепочечные ДНК-ретровирусы – вирусы сем. *Hepadnaviridae*.

При рассмотрении вирусов животных и человека в пределах одной и той же группы дополнительно учитываются:

- 1) структура генома (сегментированный, несегментированный, линейный, кольцевой);
- 2) порядок расположения генов;
- 3) (не)сходство с геномами представителей других таксонов;
- 4) строение вириона;
- 5) характер онтогенеза вируса;
- 6) способность инфицировать определенный круг хозяев и т. д.

1.6.4 Вирусы животных, содержащие геномную dsДНК

Среди вирусов, содержащих геномную dsДНК, патогенными для человека и животных являются представители четырех семейств: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Poxviridae*. *Adenoviridae* – вирусы, выделенные из железистой ткани носоглотки (1953 г.) и поражающие у человека верхние дыхательные пути, а нередко и кишечник. В настоящее время в сем. *Adenoviridae* описаны многочисленные вирусы млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных и рыб; только у человека известно свыше 50 аденовирусов. В сем. *Adenoviridae* входят два рода, обособленные на основе генетических критериев (*Atadenovirus* и *Siadenovirus*), а также три рода, в которые объединены аденовирусы в соответствии с типом хозяина (*Aviadenovirus*, *Ichadenovirus* и *Mastadenovirus*).

Представители рода *Mastadenovirus* послужили основными объектами исследований в области молекулярной биологии аденовирусов, поскольку представители этого рода вызывают заболевания у млекопитающих. Частицы аденовирусов представляют собой икосаэдр, вершины которого несут нити с концевыми утолщениями. Диаметр вириона составляет 70–80 нм (без учета длины нитей). На негативно контрастированных препаратах видны относительно крупные капсомеры. На вершинах икосаэдра находятся пентоны, к которым прикрепляются нити. Ребра и грани икосаэдра образованы гексонами, составляющими ~80 % массы вириона. Аденовирусы различаются формой и длиной нитей. Самые короткие нити имеет аденовирус тип-3, самые длинные – аденовирус тип-12. Аденовирусы группы F, или кишечные аденовирусы (тип-40 и тип-41), наряду с нитями длиной ~20 нм, содержат нити длиной ~30 нм. Нити используются для адсорбции на клеточных рецепторах. Внутри вириона находится генетический материал – линейная dsДНК в комплексе с ДНК-связывающими белками V, VII, IVa2 и μ .

Одним из важнейших структурных белков аденовируса является цистеиновая протеаза. Она процессирует белки вириона на стадии созревания, а также способствует перестройке капсида, необходимой для выхода из эндосомы на этапе проникновения в клетки. Размер генома аденовирусов варьируется в пределах от 26 тыс. п.н. (у представителей рода *Siadenovirus*) до 46 тыс. п.н. (у представителей рода *Aviadenovirus*). На концах геномной ДНК находятся инвертированные повторы, при спаривании которых образуется большая шпилька. На 5'-конце следом за ITR расположена последовательность ψ (сигнал инкапсидирования), необходимая для упаковки ДНК. Концы молекулы геномной ДНК ковалентно связаны с молекулами «терминального» белка TP, необходимого для инициации репликации.

Геном аденовирусов можно условно подразделить на четыре функциональных блока:

- 1) гены белков, обеспечивающих репликацию генома вируса, т. е. ген ДНК-полимеразы, ген предшественника белка TP, белка pTP и ген ДНК-связывающего белка DBP;
- 2) гены белков капсида и протеазы AVP, необходимой для процессинга капсидных белков;
- 3) стелс-гены, продукты которых позволяют инфицированной клетке стать «невидимой» для иммунной системы хозяина;
- 4) гены малых вирус-ассоциированных РНК, которые не транслируются и выполняют регуляторные функции.

В соответствии с очередностью их экспрессии гены аденовирусов условно подразделяются на ранние (Е) и поздние (L). Геномные участки Е1 и Е3 кодируют белки, регулирующие цикл репликации и способствующие подавлению иммунного ответа хозяина. Поздние гены кодируют в основном белки капсида.

Вирусные мРНК синтезируются клеточной РНК-полимеразой II. Большинство генов транскрибируется в направлении 5'→3', в то время как гены, необходимые для репликации ДНК (Pol, рTP и DBP), считываются в направлении 3'→5'. Обращает на себя внимание высокая плотность кодирования: при наличии всего 10 промоторов геном аденовирусов человека кодирует свыше 50 белков. Разнообразие мРНК достигается за счет посттранскрипционного процессинга (сплайсинга). Как уже отмечалось, геном аденовирусов кодирует не только белки, но и малые вирус-ассоциированные РНК (VA-RNA), которые синтезируются с помощью клеточной РНК-полимеразы III. Аденовирусы могут размножаться в разных клетках, в том числе в клетках эпителия дыхательных путей и лимфоцитах. Они строго контролируют свой онтогенез от этапа адсорбции до этапа высвобождения вирионов. В культуре клеток адсорбция вириона начинается с взаимодействия окончания нити со специфическим клеточным рецептором. В частности, аденовирусы типов-2 и -5 используют клеточный рецептор CAR – трансмембранный белок, входящий в состав плотных контактов. В свою очередь, аденовирусы группы В используют рецептор CD46. Благодаря взаимодействию нити с рецептором вирион сближается с поверхностью клетки, пентон связывается с интегринами $\alpha\beta 3$ или $\alpha\beta 5$, что индуцирует проникновение вириона путем клатрин-опосредованного эндоцитоза.

В условиях *in vivo* рецепторы CAR и интегрины обычно недоступны, поскольку они либо укрыты в зоне плотного контакта, либо экспонируются на базальной стороне клеточной мембраны. Опыты на животных показали, что в данном случае аденовирус использует иные способы проникновения. Например, при внутривенном введении вируса проникновение обеспечивается в первую очередь взаимодействием гексона с компонентами крови, в том числе с фактором коагуляции FX и/или с липидными комплексами, поэтому при внутривенном введении аденовирусные векторы неминуемо оказываются в печени. Конкретный механизм проникновения в данном случае неизвестен. Возможно, индуцируется эндоцитоз либо происходит латеральный транспорт в направлении плотных контактов. При снижении pH в полости эндосомы капсид частично разбирается и проникает в цитоплазму. Затем из него удаляются пентоны, перипентонные гексоны и внутренний белок рVI. В результате этого на поверхности капсида появляются ранее скрытые сигналы ядерной локализации (NLS), с помощью которых он по микротрубочкам транспортируется к ядру. Вблизи комплекса ядерной поры капсид приоткрывается, высвобождая коагрегат ДНК с ДНК-связывающими белками. Проникновение генома аденовируса в ядро обеспечивается белками-портинами. Транскрипция ранних генов (геномные участки Е1 и Е3) клеточной РНК-полимеразой II приводит к тому, что активируется метаболизм, клетка вступает в S-фазу (за это отвечают белки Е1А), одновременно блокируется сигнальный каскад апоптоза. Ранние белки аденовируса блокируют как внутренние сигналы апоптоза, так и внешние сигналы, исходящие от цитотоксических Т-лимфоцитов. Уже на ранней стадии инфекции клетка теряет значительную часть поверхностных рецепторов. В результате накопления ранних белков начинают экспрессироваться поздние гены, и затем происходит репликация генома. Она инициируется на обоих концах геномной ДНК в сайтах *ori*, расположенных внутри концевых инвертированных повторов (ITR). Особенность этого процесса заключается в том, что вирусная полимераза (AdVPol) использует в качестве праймера предшественник терминального белка – белок рTP. Иницирующий комплекс состоит из ДНК-полимеразы AdVPol, белка рTP, белка TP и ДНК-связывающего белка DBP, а также ядерных белков NF1 и NFIII. На первом этапе полимеразы синтезирует тринуклеотид CAT, который комплементарен не только матричному триплету GTA (в положении 4–6), но и триплету GTA, расположенному слева от него на

3'-конце. Затем иницирующий комплекс смещается в направлении 3'-конца, в результате чего триплет САТ спаривается с окончательным триплетом GTA. На этом процесс инициации заканчивается; клеточные факторы NF1 и NFIII диссоциируют от ДНК, и начинается элонгация. Полимераза AdPol отсоединяется от белка рТР и копирует ДНК в направлении 3'→5'; при этом вытесняемая нить укрывается ДНК-связывающим белком DBP. Белок рТР на дочернем дуплексе расщепляется аденовирусной протеазой и превращается в белок TP. Вытесняемая нить ДНК постепенно освобождается и в конце концов образует дуплекс с комплементарной ей нитью или внутренний дуплекс в результате спаривания ITR. Спаренные ITR содержат на 5'-конце белок TP, поэтому этот участок может также использоваться для инициации синтеза ДНК по вышеописанному механизму. Синтез и накопление вирусной ДНК в зараженной клетке приводят к активации генов рIX и IVa2, а также промотора E2 и главного позднего промотора MLP. В отличие от ранних генов, экспрессия которых иницируется шестью промоторами, экспрессия поздних генов осуществляется с главного промотора MLP. В результате образуется транскрипт, процессинг которого (путем сплайсинга и полиаденилирования) дает начало пяти семействам мРНК, трансляция которых приводит к образованию предшественников капсидных белков. Вновь синтезируемые белки-предшественники содержат сигналы ядерной локализации и транспортируются в ядро, где из них образуются незрелые капсиды, готовые к упаковке геномной ДНК. После упаковки ДНК предшественники белков капсида процессируются вирусной протеазой AVP, причем этот фермент приобретает активную конформацию только после связывания с ДНК и отщепления небольшого пептида от белка рVI. Зрелые вирионы высвобождаются при лизисе клетки. Примечательно, что этот процесс также управляется аденовирусом. В число поздних вирусных белков входит «белок смерти», который обеспечивает быстрое разрушение клетки в конце цикла репродукции. Лизис зараженных клеток и выброс «белка смерти» индуцируют гибель соседних клеток по сценарию некроза; в результате повреждения эпителия обнажаются рецепторы, используемые аденовирусом для своего проникновения.

Многие аденовирусные инфекции характеризуются некротическими поражениями тканей. В качестве примера можно назвать аденовирусные заболевания копытных, сопровождающиеся тяжелыми патологиями дыхательной системы и кишечника (вплоть до случаев массовой гибели оленей в национальных парках). Клинические проявления аденовирусных инфекций человека в первую очередь связаны с такими респираторными заболеваниями, как тонзиллиты и ангины. Аденовирусы часто становятся причиной вспышек ОРЗ в сформированных незадолго до этого замкнутых коллективах, например, в детских садах или армейских подразделениях; у детей ОРЗ обычно вызывают аденовирусы типов: -1, -2, -3, -5 и -6; у взрослых – тип-4 и тип-7. Особенно тяжело заболевание может протекать при сочетанной инфекции разными респираторными вирусами. Широко известен также аденовирусный кератоконъюнктивит. Аденовирусы группы F (тип-40 и тип-41) вызывают кишечное заболевание детей младшего возраста. По окончании острого периода болезни вирус может в течение многих лет персистировать в миндалинах, а также в пейеровых бляшках кишечника. Латентная аденовирусная инфекция может активироваться под воздействием разных факторов, например, при иммуносупрессии, связанной с трансплантацией органов, или при ВИЧ-инфекции. У иммунодефицитных больных она часто приводит к летальному исходу.

Перечислить все заболевания животных, вызываемые аденовирусами, практически невозможно. Упомянем только аденовирусный гепатит собак, гепатит и энтерит индеек и т. д. При искусственном заражении аденовирусы человека могут вызывать опухоли у новорожденных особей других видов животных, в частности аденовирус типа-12 вызывает опухоли у новорожденных хомяков. Благополучно перенесенные аденовирусные инфекции индуцируют стойкий иммунный ответ. Как правило, у взрослых уровень антиадено-

вирусных антител в крови достаточно высок, что служит серьезным препятствием на пути использования аденовирусов в качестве векторов в терапии опухолей.

Аденовирусы нечувствительны к препаратам интерферонного ряда. До некоторой степени их размножение ограничивают низкомолекулярные индукторы интерферона, в частности, циклоферон; среди необычных нуклеозидов обнаружены такие, которые проявляют активность в отношении аденовирусов, например, цидофовир (НРМРС). Однако эти вещества высокотоксичны, поэтому допускается только их местное применение в виде мазей или путем инъекции непосредственно в пораженный орган. Мишенью НРМРС служит аденовирусная ДНК-полимераза. Механизм антивирусного действия этого соединения основан на том, что оно фосфорилируется клеточными киназами и при синтезе ДНК конкурирует с обычными нуклеозидами. При последовательном включении в нить ДНК двух молекул НРМРС блокируется элонгация. Адресное воздействие НРМРС на зараженные клетки обеспечивается более высоким сродством НРМРС-дифосфата к вирусной ДНК-полимеразе, чем к ДНК-полимеразе хозяина. *Herpesviridae* обладают способностью сохраняться в латентной форме с периодической активацией и ремиссией, а также вызывать характерное клиническое проявление в виде центробежно расходящихся накожных высыпаний. Обоими свойствами, в частности, обладает вирус-1 простого герпеса, знакомый многим из нас по болезненным волдырям, появляющимся на губах, а также в области рта и ноздрей после перенесенного стресса, простудного заболевания или иного вмешательства в нормальный иммунный статус.

Еще недавно всех известных герпесвирусов человека объединяли в сем. *Herpesviridae*. Однако открытие аналогичных вирусов у других животных, в том числе амфибий, моллюсков и рыб, потребовало изменить эту классификацию. В результате появился новый порядок *Herpesvirales*, к которому, кроме *Herpesviridae*, относятся сем. *Alloherpesviridae* и сем. *Malacoherpesviridae*, а также ряд родов вне семейства. Поскольку невозможно дать подробную характеристику всех представителей сем. *Herpesviridae*, в качестве примера рассмотрим вирус простого герпеса-1 (ННВ-1). Вирус ННВ-1 может продуктивно инфицировать разные клеточные культуры, в том числе культуры лимфоцитов и культуры эпителиальных клеток. При первичном инфицировании *in vivo* он вызывает поражение эпителия, преимущественно по кайме губ, а затем системой центростремительного транспорта по аксонам переносится в спинальные ганглии, где вызывает латентную инфекцию. При неблагоприятном воздействии на организм хозяина (нервный стресс, авитаминоз, недавно перенесенное заболевание и т. д.) латентная инфекция может активироваться с переходом в продуктивную. При этом вирус переносится системой центробежного транспорта по аксонам к месту своего первичного проникновения и реинфицирует эпителий.

Частицы герпесвирусов однотипного строения. Вирион имеет липопротеиновую оболочку, содержащую свыше 20 разных белков, часть которых используется для проникновения вируса в клетки-мишени. Гликозилированные поверхностные белки вируса герпеса обозначаются, как gB-E, G-M. Белки gB и gC служат для прикрепления к клеткам-мишеням, белок gD обеспечивает слияние оболочки вириона с клеточной мембраной, а комплекс белков gE/gI улавливает Fc-фрагменты антител. Под оболочкой находится икосаэдрический капсид диаметром ~120 нм, упаковывающий вирусную ДНК.

Между оболочкой и капсидом расположен тегумент в виде аморфной массы, состоящей из белков, необходимых на ранней стадии цикла размножения вируса. Икосаэдрический капсид (T = 16) состоит из 162 капсомеров. Капсомеры, расположенные на гранях икосаэдра, содержат шесть идентичных субъединиц, образующих цилиндр с центральным каналом. В незрелых капсидах (так называемые капсиды «типа В») каналы открыты и служат для выхода вспомогательных белков, с помощью которых осуществляется сборка вирионов.

После упаковки ДНК и протеолитического расщепления вспомогательных белков каналы закрываются. Геномная ДНК упаковывается через портал – специализированный

канал на одной из вершин икосаэдра, образованный белком UL6. Поскольку герпесвирусы не имеют гистонподобных ДНК-связывающих белков, компактизация ДНК достигается в ходе упаковки в результате образования комплекса с полиаминами (спермином и спермидином). Геномная ДНК вируса HHV-1 состоит из двух ковалентно связанных сегментов – длинного и короткого, которые обозначаются как UL и US; они фланкированы инвертированными повторами *ab* и *b'a'* (в сегменте UL) и *ac* и *c'a'* (в сегменте US). Поскольку эти сегменты могут принимать разную ориентацию, в популяции вируса всегда присутствуют четыре изомера с их разным взаимным расположением. На обоих 3'-концах геномной dsДНК находятся неспаренные основания («липкие концы»), с помощью которых она замыкается в кольцо при попадании в клеточное ядро.

Геном герпесвируса HHV-1 кодирует около 85 белков, гены которых подразделяются на три блока: самые ранние (α), ранние (β) и поздние (γ). Самые ранние α -гены обеспечивают избегание иммунного ответа на начальном этапе инфекции и регулируют транскрипцию β -генов. Важнейшими из продуктов трансляции β -генов являются ДНК-полимераза и тимидинкиназа, а также ряд других белков, ответственных за метаболизм и репликацию ДНК. Поздние γ -гены кодируют белки капсида и тегумента. В повторах *a* и *a'* локализованы сигналы упаковки *pac1* и *pac2*.

Адсорбция вирионов на клетках хозяина приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран; в качестве рецепторов используются гепарансульфат, протеоглики и другие сигнальные молекулы, широко представленные на поверхности клеток млекопитающих. В результате слияния в цитоплазму высвобождается капсид, а также белки тегумента, которые быстро берут под контроль клеточные процессы. Один из белков тегумента, α -ТГФ, транспортируется в ядро и подготавливает транскрипцию ранних вирусных генов. Другой белок, VHS, блокирует синтез клеточных белков, разрушая цитоплазматические мРНК. Капсиды доставляются к ядерным порам по микротрубочкам. Возле комплекса ядерной поры капсид приоткрывается и высвобождает вирусную ДНК в нуклеоплазму, где она релаксируется и замыкается в кольцо.

Циклу репликации герпесвирусов свойственна каскадная регуляция транскрипции. Сначала клеточная РНК-полимераза II под контролем белка α -ТГФ осуществляет транскрипцию самых ранних α -генов. В результате этого синтезируется шесть мРНК, которые экспортируются в цитоплазму на предмет трансляции. Один из самых ранних белков, US47, блокирует презентацию вирусных пептидов на поверхности инфицированной клетки, а остальные белки направляются в ядро и после достижения необходимой концентрации запускают второй раунд транскрипции – теперь уже β -генов. Следует отметить, что одним из продуктов β -генов является вирусная тимидинкиназа, служащая мишенью для противовирусного препарата «Ацикловир». На данной стадии происходит распад хозяйского хроматина, продукты деградации которого конденсируются на внутренней мембране ядерной оболочки; ядрышко также деградирует. Продукты трансляции β -генов накапливаются в ядре и индуцируют транскрипцию поздних γ -генов, преимущественно кодирующих белки капсида.

Сборка капсида осуществляется с помощью вирусных и клеточных факторов; основная роль в ней принадлежит вспомогательному вирусному белку ORF, или скэфолд-белку, который в ходе упаковки вирусной ДНК демонтируется и удаляется. Готовые к упаковке капсиды имеют форму концентрических двойных колец и называются капсидами «типа В». Кроме них, на ультратонких срезах часто видны капсиды «типа А», не содержащие вспомогательный белок. Считалось, что предварительно образуются капсиды «типа А», превращающиеся в капсиды «типа В», однако в настоящее время их рассматривают как побочный продукт abortивной упаковки, при которой иницируются только фрагментация и выброс вспомогательного белка. Нарезание конкатемеров на мономеры и упаковка вирусной ДНК осуществляются с помощью рестриктазно-упаковочного комплекса на одной из вершин капсидов «типа В». Капсиды присоединяются к конкатемерам в стыках мономеров, вирусная рестриктаза разрезает ДНК, и один из свободных концов начинает втягивать-

ся в капсид. После упаковки каналы капсомеров закрываются, и поверхность нуклеокапсид приобретает сродство к белкам тегумента, предварительно накопленным в ядре. Затем нуклеокапсид покрывается белками тегумента и отпочковывается от внутренней мембраны ядерной оболочки в перинуклеарную вакуоль, временно приобретая липопротеиновую мембрану. На следующем морфогенетическом этапе вирус «переодевается» в аппарате Гольджи. После приобретения окончательной оболочки и недостающих компонентов тегумента вирусная частица покидает клетку путем экзоцитоза.

Герпесвирусы обладают многочисленными, в том числе изощренными механизмами избегания иммунного ответа хозяина. Латентная инфекция устанавливается в клетках, наименее подверженных иммунному надзору, например, в нейронах или в собственно клетках иммунной системы. В свою очередь, литическая репродукция и распространение вируса в пределах организма требуют защиты инфицированных клеток от распознавания цитотоксическими лимфоцитами, НК-клетками и системой комплемента.

Один из способов ухода вируса HHV-1 от иммунного ответа состоит в нейтрализации антител. В норме антитела класса IgG, синтезируемые В-лимфоцитами, присоединяются посредством своих Fab-фрагментов к рецепторам gD или gC на поверхности инфицированных клеток, в то время как наружные Fc-фрагменты служат для узнавания зараженных клеток лимфоцитами, а также для активации системы комплемента. Однако вирусные гликопротеины gE и gI связывают Fc-фрагменты, что блокирует активацию системы комплемента, а также препятствует уничтожению инфицированных клеток макрофагами и цитотоксическими Т-лимфоцитами. Кроме того, поверхностный белок gC вируса HHV-1 связывает фактор C3 системы комплемента, блокируя образование атакующего комплекса.

Одним из наиболее изощренных методов избегания иммунного ответа является модификация клеточных рецепторов, необходимых для распознавания инфицированной клетки цитотоксическими лимфоцитами. В данном случае вирус HHV-1 снижает экспрессию компонентов главного комплекса гистосовместимости, задерживая их транспорт к поверхности клетки при помощи белка ICP47, который присоединяется к транспортному комплексу TAP. Эффективными лекарственными средствами, которые неспецифически подавляют репродукцию вируса HHV-1, являются препараты интерферонного ряда, а также индукторы интерферонов. Однако их использование ограничено из-за опасности возникновения побочных эффектов.

Наибольшее применение в терапии герпесвирусных инфекций получили атипичные нуклеозиды. Один из них – широко известный препарат «Ацикловир» («Зовиракс»), за разработку которого американским химикам Г. Элион, Дж. Блэку и Дж. Хитчингсу была присуждена Нобелевская премия по химии 1988 г. Ацикловир является ациклическим аналогом гуанозина. Механизм антивирусного действия этого соединения состоит в том, что в инфицированных клетках вирусная тимидинкиназа ТК производит его первое фосфорилирование. Второе и третье фосфорилирование ацикловира осуществляются клеточными киназами, после чего ацикловиртрифосфат становится субстратом вирусной полимеразы и блокирует синтез геномной ДНК. Кроме него, при лечении герпесвирусных инфекций используются сходные соединения – валацикловир, пенцикловир, фамцикловир и т. д., а также индукторы интерферона, в частности, циклоферон.

Помимо вируса простого герпеса HHV-1 (а также сходного с ним вируса HHV-2), которые преимущественно вызывают кожные поражения, известны другие представители сем. *Herpesviridae*, инфицирующие человека. Все они так же, как вирусы простого герпеса, осуществляют пожизненную инфекцию, однако на этот раз заражаются не нейроны, а клетки других типов (кроме вируса HHV-3). Известно восемь герпесвирусов человека, в числе которых вирус ветрянки/опоясывающего лишая, вирус Эпштейна – Барр, цитомегаловирус и др.

Papillomaviridae обладают ярко выраженным тканевым тропизмом и заражают клетки базального слоя эпителия. Инфекция протекает либо бессимптомно, либо с периодиче-

скими обострениями. Во втором случае в инфицированной зоне появляются характерные доброкачественные новообразования – бородавки и папилломы; название семейства является аббревиатурой этих симптомов (лат. *papilla* – сосочек и греч. *oma* – опухоль). Локальная трансформация эпителия наблюдается на коже и в области верхних дыхательных путей, реже – на конъюнктиве, в ротовой полости, пищеводе и прямой кишке.

Безобидные, на первый взгляд, папилломавирусы привлекли к себе внимание в 1933 г., когда американский вирусолог Р. Шоуп доказал, что они могут вызвать рак кожи у кроликов. Немецкий вирусолог Х. цур Хаузен, открывший первый онкогенный папилломавирус, стал одним из лауреатов Нобелевской премии 2008 г. по физиологии и медицине. Папилломавирусы проявляют строгую специфичность в отношении своих хозяев, которыми являются рептилии (например, черепахи), птицы и млекопитающие; случаи передачи вируса от одного вида к другому чрезвычайно редки. Круг хозяев папилломавирусов и локализация вызываемых ими новообразований служат дискриминирующими признаками видов и подвидов.

Виды сем. *Papillomaviridae* традиционно обозначают как «типы». В настоящее время их описано свыше 140, которые принадлежат к 16 родам. Вирионы папилломавирусов устроены однообразно – поликлональные антитела против структурных белков бычьего папилломавируса 1-го типа связываются с капсидами других папилломавирусов человека и животных. Благодаря такому консерватизму антигенных детерминант папилломавирусы легко выявляются в эпителии разных тканей и органов с помощью методов иммунодиагностики. Икосаэдрические капсиды папилломавирусов ($T = 7$) имеют относительно небольшой размер (52–55 нм) и содержат 72 капсомера, состоящих из структурных белков L1 и L2. В укладке геномной ДНК участвуют «позаимствованные» ядерные гистоны H2a, H2b, H3 и H4. В результате взаимного перекрывания ORF относительно небольшая хромосома папилломавирусов (~8 тыс. п. н.) содержит 8–10 генов. Гены папилломавирусов подразделяются на две группы: ранние – E1, E2, E4–E7 и поздние – L1 и L2.

Порядок расположения генов одинаков у всех представителей семейства. Между генами E6 и L1 расположена протяженная контролирующая область, которая содержит сайты связывания регуляторных белков, а также промотор ранних генов p97, сайт инициации репликации *ori*, и промотор поздних генов p67. Большинство белков папилломавирусов содержит несколько функциональных доменов. Белок E1 участвует в инициации репликации и регулирует копийность вирусных мини-хромосом; регуляторный белок E2 связывается с областью LCR; полифункциональный белок E4 способствует циклизации вирусной ДНК, а также дезинтеграции хозяйского цитоскелета при выходе вирионов; белки E5, E6 и E7 участвуют в трансформации клетки; белки L1 и L2 являются структурными; функция белков E3 и E8 неизвестна.

Папилломавирусы распространяются контактным способом; входными воротами инфекции служат микроповреждения поверхности эпителия. Предполагается, что для первичной адсорбции папилломавирусов используются в качестве рецепторов гепарансульфат и протеогликаны. Папилломавирус HPV нуждается во втором рецепторе – интегрине (мембранном белке эпителиальных клеток). В начале инфекционного цикла папилломавирусу необходимо попасть в делящиеся клетки базального слоя эпителия. Проникновение происходит путем клатрин-опосредованного или кавеолин-опосредованного эндоцитоза. Декапсидирование осуществляется в поздней эндосоме (или в фаголизосоме). Структурный белок L2 обеспечивает транспорт геномной ДНК в ядро, где она транскрибируется клеточными ферментами. Большинство папилломавирусов осуществляет только продуктивную инфекцию. Ранние этапы инфекции растянуты во времени; первые вирусные мРНК появляются только через 12 часов после первичного инфицирования.

Белок E2 может служить как активатором, так и репрессором «раннего» промотора p97. Когда его мало (начало инфекции), он присоединяется только к сайтам 3 и 4 области LCR и служит активатором; когда его много, он дополнительно связывается с сайтами 1 и 2. Тран-

скрипция поздних генов L1 и L2 осуществляется с «позднего» промотора p67; она сопровождается сменой раннего сайта полиаденилирования (PAE) на поздний (PAL).

Инициаторами репликации геномной ДНК служат белки E1 и E2. Белок E2 является ДНК-связывающим; он распознает палиндромные последовательности AACCG(N)4CGGTT, расположенные в области LCR. Белок E1 также обладает ДНК-связывающими свойствами, но они слабее выражены. В начале инфекции число копий белка E1 невелико, и с сайтом *ori* связывается комплекс белков E1/E2, который локально расплетает dsДНК. Затем, по мере удаления белка E2, к области LCR присоединяются новые молекулы белка E1. Последние образуют двойное гексамерное кольцо (которое имитирует структуры, образующиеся в сайтах *ori* на хозяйских хромосомах); в эту же область привлекаются компоненты клеточного репликазного комплекса – белок A и праймаза. В делящихся клетках базального слоя эпителия в конце S-периода число копий вирусного генома достигает 50–200. Вирусная ДНК при посредстве белка E2 и специализированных клеточных белков связывается с микротрубочками веретена, что обеспечивает эквивалентное распределение копий вирусного генома между дочерними клетками.

Некоторые папилломавирусы могут подолгу реплицироваться в форме плазмиды; в частности, в стволовых кератиноцитах они сохраняются в течение нескольких лет. На поздних стадиях размножения используется белок E5. Взаимодействуя с протонной АТФ, он тормозит закисление полости эндосомы и нарушает процессы рециклизации поверхностных рецепторов. Тем самым обеспечивается благоприятная среда для репродукции вируса, а клетки верхних слоев эпителия обогащаются рецептором EGF.

Активация позднего промотора связана с дифференциацией клетки. В этом случае число геномных копий вируса не ограничивается, начинают синтезироваться структурные белки, среди них – ДНК-связывающий белок L2, который содержит сигнал ядерной локализации.

Другой структурный белок, L1, попадает в ядро в составе капсомеров. Помимо структурных белков, в сборке капсида и упаковке ДНК участвуют вирусный белок E2 и клеточный шаперон Hsp70. Вирусные частицы выходят из клеток, переместившихся в поверхностный слой эпителия. Ключевую роль в процессе лизиса играет белок E4, который разрушает субмембранные кератиновые волокна.

Инфекционные вирусные частицы попадают во внешнюю среду в результате слущивания клеток поверхностного слоя эпителия. Папилломавирусы достигают базального слоя эпителия через микротравмы любой этиологии; эффективность заражения очень высока (для него достаточно нескольких частиц). Продуктивная инфекция характеризуется разрастанием эпителия из-за усиления пролиферативной активности в базальном и надбазальном слоях. При этом толщина эпителия увеличивается, а его структура изменяется. В основе патогенеза лежит нарушение регуляции клеточного цикла под воздействием белков E6 и E7. Мишенями служат опухолевые супрессоры – белок ретинобластомы (pRb) и белок 53.

Самые опасные патологии – неоплазии и карциномы – возникают в результате встраивания геномной ДНК папилломавируса в клеточный геном. Этому предшествует переход кольцевой ДНК в линейную форму. Из-за разрыва в области E1 – E2 нарушается транскрипция с «позднего» промотора, и в интегрированной ДНК экспрессируются только гены белков E6 и E7; избыточное накопление их продуктов в первую очередь способствует малигнизации клеток. Для папилломавирусов группы высокого риска установлено, что белок E7 обладает более высоким аффинитетом по отношению к супрессору pRb, чем тот же белок у группы низкого риска. Помимо присутствия интегрированного вируса HPV (группа высокого риска) возможность злокачественного перерождения определяется накоплением множественных повреждений в клеточной ДНК, а также активацией превращения эстрадиола в 16β-гидроксистерон. Многообразие факторов, влияющих на уровень экспрессии генов вирусных белков, а также сложная систе-

ма клеточного иммунитета препятствуют малигнизации (например, при цервикальных поражениях часто происходит самопроизвольная элиминация вируса).

Poxviridae по ряду признаков отличаются от остальных ДНК-содержащих вирусов:

- геном кодирует ферменты репликации ДНК;
- ферменты первичной транскрипции упаковываются в вирион;
- цикл размножения происходит в цитоплазме;
- образуется два типа инфекционных частиц;
- выход из хозяйской клетки осуществляется разным способом;
- заболевания человека имеют характерную симптоматику.

Натуральная человеческая оспа распространяется воздушно-капельным путем или при физическом контакте с больным. Вирус размножается в эндотелии сосудов кожи, ротовой полости и носоглотки, а также может колонизировать поверхностные сосуды роговицы (что приводит к ее изъязвлению и, как следствие, к «оспенной» слепоте). В результате подавления вирусом иммунных реакций точечные кожные кровоизлияния (первичные оспенные пятна) трансформируются в очаги вторичной бактериальной инфекции в виде гнойных пузырьков, или пустул, что вызывает генерализованную интоксикацию. Характерные для оспы обильные кожные высыпания последовательно проходят стадии пятен, гнойных пузырьков и пустул; в случае выздоровления пустулы превращаются в корочки, после отпадения которых остаются рубцы (оспенные рябинки). Из-за повреждения базальной мембраны они сохраняются пожизненно. В соответствии с кругом хозяев вируса сем. *Poxviridae* подразделяется на два подсемейства: *Chordopoxvirineae* и *Entomopoxvirineae*. К подсем. *Chordopoxvirineae* (поксвирусы хордовых) относятся восемь родов: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* и *Yatapoxvirus*. К подсем. *Entomopoxvirineae* (поксвирусы насекомых) относятся три рода – *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* и *Gammaentomopoxvirus*. Вирионы поксвирусов самые крупные у вирусов животных, их эллипсоидные или скругленно-прямоугольные частицы имеют размер 220–450 × 140–260 нм. В результате сборки вириона образуются инфекционные частицы двух типов – зрелые внутриклеточные (IMV) и оболочные внеклеточные (EEV). В обоих случаях сердцевина (кор), содержащая геномную ДНК, на срезе имеет форму лежащей на боку восьмерки. Сложная оболочка состоит из 2–3 мембранных слоев, в состав которых включено около 100 разных белков. Наружная мембрана содержит гликопротеины, которые образуют спирально уложенные валики; у EEV-частиц имеется дополнительная внешняя мембрана, поверхность которой покрыта трубчатыми белковыми придатками. Под внутренним мембранным слоем находятся два белковых включения, так называемые *латеральные тела*. На концах линейной dsДНК расположены длинные (до 10 тыс. п.н.) инвертированные терминальные повторы (ITR). Концы нитей ковалентно замкнуты и формируют небольшие петли, рядом с которыми находятся участки с короткими (54–70 п.н.) тандемными повторами. Благодаря такой концевой структуре ДНК предохраняется от прогрессивного укорочения (механизм репликации линейных хромосом усложняется тем, что ДНК-полимераза неспособна копировать dsДНК со срезанного конца; напомним, что для наращивания полинуклеотидной нити в направлении 5'→3' требуется РНК-праймер, а после его удаления остался бы нереплицированный 3'-участок). Размер генома поксвирусов лежит в пределах 139–289 тыс. п. н. В частности, геном вируса VACV насчитывает свыше 200 генов. В центральной области молекулы ДНК находится консервативный участок размером ~100 тыс. п. н. По концам расположены участки, которые содержат гены, контролирующие взаимодействие вируса с хозяином. Цикл репродукции лучше всего изучен у вируса VACV, хотя многое остается неясным. В частности, неидентифицированы клеточные рецепторы. Вероятно, они специфичны у клеток разных тканей; в качестве примера можно назвать рецептор эпидермального фактора роста (EGF). Проникновение может осуществляться путем фагоцитоза (в случае IMV-частиц) или слияния внешней мембраны оболоч-

ки вириона с клеточной мембраной (в случае EMV-частиц). Весь цикл размножения проходит в цитоплазме с образованием характерных включений – «телец Гварнери». После проникновения наружная мембрана сбрасывается, а кор, окружающая его внутренняя мембрана и белки матрикса попадают в цитоплазму. Размножение начинается с ранней транскрипции, которая осуществляется вирусной ДНК-зависимой РНК-полимеразой. На этой стадии экспрессируются все гены, отвечающие за синтез вирусной ДНК или РНК (исключение составляет входящая в состав вириона топоизомераза I, которая синтезируется на стадии поздней транскрипции). Вирусные мРНК транскрибируются с обеих нитей ДНК и транслируются в отсутствие сплайсинга. При содействии ранних вирусных белков происходит второе раздевание (с потерей внутренней мембраны и белков кора), и «голая» вирусная ДНК оказывается в цитоплазме. Следующая, репликативная стадия проходит в виросоме, которая образуется в околядерной области; при этом частично разбираются центриоли, реорганизуется система микротрубочек. Поскольку в виросоме концентрируются ДНК и белки вируса, она выявляется в цитоплазме при световом микроскопировании в виде крупного эозинофильного включения, получившего название «тельце Гварнери» – в честь итальянского врача Дж. Гварнери, впервые описавшего его в 1893 г. Перед началом репликации эндонуклеаза надрезает одну из нитей в участке инвертированных повторов; концевые петли расплетаются, и образуются свободные 5'-концы. Полимеразный комплекс, состоящий из ранних вирусных белков, достраивает комплементарную нить по механизму синтеза ведущей нити. После этого ДНК-геликаза вируса «разводит» концы вновь синтезированной dsДНК, которые за счет инвертированных повторов образуют шпильки. Затем ДНК-полимераза достраивает недостающий фрагмент нити в направлении 3'→5'. Образующиеся конкатемеры могут состоять из двух и более геномных копий. Нарезание конкатемеров на мономеры приводит к образованию зрелых молекул геномной ДНК. Поздняя транскрипция, при которой образуются структурные белки, тесно связана с репликацией и начинается в среднем через 2,5 часа от начала инфицирования. Сборка вирионов у вируса VACV – сложный процесс. Предполагается, что комплекс вирусных нуклеиновых кислот и белков удерживается в виросоме цитоскелетными элементами (микрофиламентами и микротрубочками). На его основе образуется кор, или незрелый вирион (IV). Последний транспортируется в аппарат Гольджи, приобретает там мембранную оболочку и превращается в IMV-частицу, которая, в свою очередь, доставляется по микротрубочкам на периферию клетки. Вирус VACV может выйти из клетки-хозяина тремя способами:

- 1) IMV-частицы освобождаются в результате лизиса;
- 2) IMV-частицы отпочковываются от клеточной мембраны и превращаются в EEV-частицы;
- 3) отпочковывание сопровождается формированием актинового «хвоста», который подпирает вырост мембраны и выталкивает EEV-частицу в межклеточное пространство или в соседнюю клетку.

Весь цикл завершается за 12 часов, что достаточно быстро для такого сложного построения вируса.

Защитная реакция на вирусную инфекцию состоит из двух стадий:

- 7) первичной, неспецифичной, стадии, ведущую роль в которой играют воспалительные процессы;
- 8) вторичной, высокоспецифичной, стадии, в которой участвуют иммунокомпетентные клетки. В ходе эволюции ортопоксвирусы приобрели набор генов, продукты которых служат модуляторами как неспецифических, так и специфических иммунных реакций.

Ключевую роль в индукции первичной стадии защиты играют цитокины (фактор некроза опухолей, интерферон IFN- γ , интерлейкин-1 β , хемокины и др.), а также система комплемента плазмы крови. Однако у поксвирусов имеются белки, которые связываются со всеми перечисленными молекулами, причем они синтезируются уже на ранних этапах инфекции. Поксвирусы устойчивы к интерферону, поскольку у них имеется по крайней мере четыре гена, продукты которых вторгаются в систему интерферона или непосред-

ственно его блокируют. На поздней, высокоспецифичной стадии защиты цитокины индуцируют систему апоптоза и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако белки поксвирусов связывают цитокины, что препятствует появлению иммунокомпетентных клеток и не позволяет ликвидировать инфекцию. Интересно отметить, что, хотя вирусные рецепторы цитокинов отличаются от своих клеточных аналогов, они высокоспецифичны по отношению к лигандам. Вирус осповакцины не обладает полным набором белков-иммуномодуляторов – возможно, это одна из причин его слабой вирулентности.

1.6.5 Вирусы животных и человека, содержащие геномную ssДНК

К этой группе относится сем. *Circoviridae* (первоначально в нем было два рода, позднее к ним добавился род *Anellovirus*, который недавно был обособлен в сем. *Anelloviridae*) и сем. *Parvoviridae*. Для экспрессии генов этих вирусов необходимо, чтобы транскрипции предшествовал синтез второй нити ДНК. Вирусы сем. *Circoviridae*, *Anelloviridae* и *Parvoviridae* имеют большое эпидемиологическое значение. Цирковирусы и парвовирусы являются возбудителями болезней человека и хозяйственно-важных животных. В свою очередь, у людей в последнее время стали все чаще регистрироваться анелловирусные инфекции. Представители сем. *Circoviridae* примечательны тем, что их геномы имеют минимальный размер среди геномов автономно размножающихся (т. е. без участия хелперов) вирусов ядерных организмов. Образное название этого семейства объясняется кольцевой формой геномной ssДНК. В сем. *Circoviridae* два рода, *Circovirus* и *Gyrovirus*. К роду *Circovirus* принадлежат цирковирусы копытных. Наиболее опасны возбудители системного заболевания поросят, при котором поражаются пищеварительная и дыхательная системы, и животное погибает от истощения. Спектр хозяев рода *Gyrovirus* включает в себя несколько семейств диких и домашних птиц. Наиболее изучен вирус анемии кур, которая особо опасна для цыплят на протяжении 10 дней с момента вылупления.

Безоболочные икосаэдрические вирионы цирковирусов ($T = 1$) состоят из 12 пентамерных субъединиц и имеют размер 18–27 нм. У представителей рода *Circovirus* размер генома 1,8 тыс. н., что соответствует минимальному размеру полноценного вирусного генома. Геном представителей рода *Gyrovirus* несколько большего размера (2,3 тыс. н.). В геноме цирковирусов выявлены две-три достоверные и несколько потенциальных ORF. Одна из них кодирует белок капсида, другая – белок Rep, отвечающий за инициацию репликации. Еще один из белков обладает способностью индуцировать апоптоз. Некоторые ORF расположены на второй нити ДНК, которая синтезируется после попадания в ядро клетки-хозяина, т. е. эти вирусы имеют «двусмысленные» геномы. Репродукция цирковирусов происходит в ядре. Сначала при помощи хозяйской ДНК-полимеразы достраивается вторая нить геномной ДНК. Затем с вирусной матрицы считываются мРНК, одна из которых транслируется на цитоплазматических рибосомах в белок Rep. Белок Rep возвращается в ядро и иницирует репликацию вирусной ДНК по механизму «катящееся кольцо», что приводит к синтезу конкатемеров – цепочки одонитевых вирусных геномов. Последние либо достраиваются до двунитевой молекулы (что создает новые матрицы для транскрипции и репликации), либо инкапсидируются с образованием потомства вирионов. Вирионы выходят из клетки посредством отпочкования, однако в дальнейшем не сохраняют мембранную оболочку.

В 1997 г. в Японии у пациента, заболевшего в результате переливания крови гепатитом неясной этиологии, был обнаружен новый вирус, названный «вирусом, передающимся при переливании крови». Его отнесли к роду *Anellovirus*. Вирионы анелловирусов имеют размер 30–40 нм. Геномная ДНК (3,8 тыс. н.) содержит четыре ORF и реплицируется тем же способом, что у цирковирусов. Инфекционный цикл анелловируса протекает так же, как и у цирковирусов, т. е. вирус может репродуцироваться в клетках разных тканей, хотя есть данные о том, что он «предпочитает» гепатоциты и лейкоциты.

Род *Anellovirus* состоит из нескольких квазивидов, представители которых, по последним данным, инфицируют в некоторых странах свыше 90 % населения. Кроме того, один и тот же человек может одновременно заражаться несколькими штаммами вируса, что приводит к высокому уровню рекомбинационной изменчивости вирусного генома. Геномный полиморфизм и глобальное распространение вируса, а также факты обнаружения его вирионов не только в крови, но и в выделениях (слюне, фекалиях) дают основание считать, что механизмы распространения этих вирусов разнообразны. Тем не менее, основным остается воздушно-капельный путь передачи. Поскольку инфекция вирусом протекает бессимптомно, ее считают относительно безопасной. Однако очень часто анелловирус обнаруживают у больных с патологиями печени, что все-таки заставляет подозревать его в патогенности.

Парвовирусы – одни из самых мелких. В то же время их частицы являются одними из самых стабильных: они устойчивы к воздействию кислот, щелочей и других агрессивных химических реагентов, а также к нагреванию до 50 °С. Эти вирусы подразделяют на два подсемейства, одно из которых (*Parvovirineae*), содержащее пять родов, ассоциировано с млекопитающими, а второе (*Densovirineae*), в котором четыре рода, – с насекомыми. Парвовирусы млекопитающих высокоспецифичны по отношению к своим хозяевам: почти для каждого вида характерен «свой» штамм парвовируса. Ряд парвовирусов обнаружен у человека, однако только один вид (*Parvovirus B19*, который на самом деле относится к роду *Erythrovirus*) вызывает неопасное заболевание – инфекционную эритему, осложнением которой становится малокровие. Парвовирусам также приписывают роль в развитии артритов, хотя механизмы развития этих заболеваний еще слабоизучены.

Широкую известность парвовирусам принесли болезни домашних животных – парвовирусный энтерит собак («олимпийка») и панлейкопения кошек. До создания соответствующих вакцин эти болезни, как правило, имели летальный исход. Парвовирусы, в отличие от большинства других ДНК-содержащих вирусов, не обеспечивают репликацию собственной ДНК, и поэтому им необходимо попасть в клетки растущих или интенсивно обновляющихся тканей с высокой активностью ДНК-полимеразы. Они поражают в первую очередь эпителий желудочно-кишечного тракта, лимфатическую систему и стволовые клетки кроветворной системы. Под их воздействием у молодых животных могут происходить необратимые изменения сердечной мышцы и тканей головного мозга.

Безоболочные икосаэдрические частицы парвовирусов имеют размер 18–26 нм и состоят из 60 капсомеров, которые, в свою очередь, образованы одним-трем протомерами. В капсид парвовируса упакована ssДНК размером 4–6 тыс. н. (соотношение числа вирионов с плюс- и минус-нитями – примерно равное). На концах молекулы находятся длинные (150–250 н.) инвертированные концевые повторы (ITR), которые содержат несколько палиндромных участков и образуют T-образные шпильки, необходимые для репликации геномной ДНК. Она осуществляется по принципу вытеснения нити без использования РНК-затравки – вместо этого действует уникальный механизм автопраймирования. В качестве затравки для синтеза комплементарной нити используется шпилька на 3'-конце (которая, по-видимому, сама не реплицируется). По завершении репликации эндонуклеаза делает разрез внутри ITR материнской нити, и образовавшийся 3'-конец праймирует полимеризацию до конца нити ДНК. Таким образом, исходная шпилька входит в состав дочерней нити, а комплементарная ей последовательность достраивается в материнской нити. Эндонуклеаза остается ковалентно связанной с 5'-концом материнской нити. Реплицированный 3'-конец ДНК-интермедиата за счет палиндромов вновь образует шпильку, с которой начинается следующий раунд репликации с вытеснением материнской нити. В итоге синтез дочерней нити ДНК сопровождается вытеснением материнской нити из образующегося дуплекса; вторым продуктом является двунитевой репликативный интермедиат. Вытесненная ssДНК, в свою очередь, может стать матрицей для репликации или войти в состав нового вириона.

Парвовирусная инфекция начинается после контакта вириона с клеточными гликопротеинами, несущими на конце молекулы остатки сиаловой кислоты. В частности, рецептором для вируса *Parvovirus* B19 служит поверхностный антиген (Р-антиген) клеток эритроидного ряда. Некоторые парвовирусы используют трансферриновый рецептор. В частности, возбудитель панлейкопении кошек стал вызывать вирусный энтерит у собак в результате мутации капсидного белка, которая придала ему способность взаимодействовать с трансферриновым рецептором представителей псовых (сем. *Canidae*). Главный белок капсида обладает фосфолипазной активностью, в результате чего вирус проникает в цитоплазму, а затем с помощью неизвестного механизма транспортируется в ядро, где высвобождается геномная ДНК. Для транскрипции вирусных генов необходима комплементарная нить ДНК, которая синтезируется в S-фазе клеточного цикла. РНК-полимераза вступает во взаимодействие с «привычной» dsДНК-матрицей, в результате чего синтезируется несколько мРНК. Важнейшие из ранних транскриптов, мРНК, транслируются в неструктурные белки NS1 и NS2. Они участвуют в репликации вирусного генома, разрезая в материнской нити ДНК-интермедиат и фиксируя 5'-конец. Репликация протекает крайне быстро и эффективно. Белок NS1 также активирует внутренний промотор, с которого начинается транскрипция генов, отвечающих за синтез белков капсида. Окончательная сборка капсидов и упаковка геномных ДНК также осуществляются в ядре. Поскольку вирус покидает клетку путем отпочкования, она некоторое время не лизируется, что повышает урожай вирионов и способствует распространению инфекции.

Представители сем. *Parvoviridae* зависят от репликационной активности клеток хозяина, однако неспособны стимулировать их пролиферацию, т. е. не являются онкогенными. Напротив, они часто оказывают онколитическое действие, заражая и лизируя интенсивно делящиеся клетки опухолей.

Представитель рода *Dependovirus* парвовирус AAV может использоваться для «трансфекции» клеток млекопитающих (т. е. их трансформации с помощью инфекционной вирусной нуклеиновой кислоты) в целях генотерапии. Он вызывает латентную инфекцию, и для его эффективной репродукции необходим вирус-хелпер, в роли которого могут выступать аденовирусы, герпесвирусы или вирус осповакцины. Вирус AAV самостоятельно проникает в клетку, после чего его геномная ДНК почти в 100 % случаев встраивается в один и тот же участок короткого плеча 19-й хромосомы, что позволяет избежать случайной интеграции и нежелательных эффектов «слепой» трансформации. Ценным качеством вируса AAV является его неиммуногенность – процедуру трансфекции можно повторять многократно, не рискуя вызвать иммунный ответ у организма, подвергающегося генотерапии.

1.6.6 Вирусы животных, содержащие геномную dsРНК

Вирусы, содержащие dsРНК, имеют ряд особенностей:

- 1) сегментированный геном;
- 2) безоболочный вирион, содержащий РНК-зависимую РНК-полимеразу;
- 3) неполное раздевание вируса;
- 4) образование потомства вирионов в цитоплазме.

К этой группе относятся сем. *Birnaviridae* и *Reoviridae*. Поскольку представители сем. *Birnaviridae* вызывают инфекционный бурсит кур и инфекционный некроз поджелудочной железы рыб, а у млекопитающих не обнаружены, это семейство не рассматривается более подробно. К представителям сем. *Reoviridae* принадлежат безоболочные вирионы диаметром 60–95 нм, содержащие 9–12 сегментов генома, размер которого лежит в пределах от 15 до 28 тыс. п. н. Сем. *Reoviridae* включает два подсем.: *Sedoreovirineae* и *Spinareovirineae*.

Представители 15 родов реовирусов инфицируют протистов и растения, а также беспозвоночных и позвоночных животных. Подсем. *Spinareovirineae* состоит из родов *Cardoreovirus* (геном состоит из 12 сегментов), *Mimoreovirus* (геном состоит из 11 сегмен-

тов), *Orbivirus* (геном состоит из 10 сегментов), *Rotavirus* (геном состоит из 11 сегментов) и *Seadornavirus* (геном состоит из 12 сегментов), к которым принадлежат вирус китайского мохноногого краба, вирус африканской чумы лошадей, а также кишечные инфекции птиц и млекопитающих. В свою очередь, подсем. *Spinareovirineae* состоит из родов *Aquareovirus* (геном состоит из 11 сегментов), *Coltivirus* (геном состоит из 12 сегментов), *Cypovirus* (геном состоит из 10 сегментов), *Dinovernavirus* (геном состоит из 9 сегментов), *Idnoreovirus* (геном состоит из 10 сегментов) и *Orthreovirus* (геном состоит из 10 сегментов), к которым принадлежат вирусы, вызывающие лихорадку у человека, инфицируя эритроциты, а также вирусы, поражающие насекомых, рептилий, птиц и млекопитающих.

Среди представителей сем. *Reoviridae* наибольший интерес представляют ротавирусы. Особенности рассмотрим на примере ротавирусов группы А человека. Ротавирусная инфекция – одна из самых распространенных кишечных инфекций. Ей подвержены дети в возрасте до 7 лет. Заболевание протекает в очень тяжелой форме, с высокой температурой и признаками интоксикации (диарея, рвота); по всему миру от ротавирусной инфекции ежегодно умирает до 650 тыс. детей. При излечении от ротавирусной инфекции приобретается стойкий иммунитет. С 2006 г. в экономически развитых странах проводится противоротавирусная вакцинация.

Капсид ротавируса представляет собой икосаэдр ($T = 13$) из трех концентрических белковых слоев. Внешний белковый слой зрелого капсида состоит из 780 молекул гликопротеина VP7 и 60 шипов, образованных димерами рецепторного белка VP4. В процессе созревания вириона белок VP4 разрезается на два фрагмента – VP8* и VP5*; белок VP8* образует дистальный глобулярный домен шипа, а белок VP5* связывает его с промежуточным капсидом. Промежуточный икосаэдрический ($T = 13$) белковый слой капсида состоит из 260 тримеров белка VP6. Внутренний икосаэдрический ($T = 1$) белковый слой капсида образован димерами белка VP2. В трехслойный белковый капсид заключен кор вирусной частицы – 11 сегментов генома, 11 молекул белка VP1 и 11 молекул белка VP3.

Характерной особенностью вириона ротавирусов служат каналы, пронизывающие все слои капсида. Они открываются на 11 вершинах икосаэдра и служат для экспорта вирусных мРНК в цитоплазму. Поскольку число сегментов генома на один меньше, чем число вершин, предполагают, что 12-я вершина отличается по строению от остальных. В дополнение к вершинным каналам на гранях икосаэдра расположено 120 каналов, которые служат для импорта метаболитов, необходимых для синтеза мРНК. Сегменты генома уложены внутри капсида в компактные структуры в форме конусовидных спиралей, закрученных вокруг белков VP1 и VP3 транскриптазного комплекса. Каждый сегмент генома кодирует по одному белку, за исключением 11-го, кодирующего белки NSP5 и NSP6. В геноме ротавируса закодировано много неструктурных белков, принимающих участие в регуляции трансляции, упаковке генома и морфогенезе вирусных частиц.

Ротавирусы заражают эпителиальные клетки тонкой кишки на верхушках ворсинок. За прикрепление отвечают белки VP4 и VP7 наружного слоя капсида. Проникновение осуществляется в несколько стадий, на которых вирусные белки взаимодействуют с разными молекулярными компонентами клеточной мембраны. Сначала глобулярный домен гликопротеина VP4 (VP8*) связывается с остатками сиаловых кислот, что вызывает изменение его конформации. В результате этого проксимальный домен VP5* получает возможность связаться с рецепторами-интегринами $\alpha 2\beta 1$ и корецептором – белком теплового шока hsp70. Второй вирусный гликопротеин (VP7) взаимодействует с интегринами $\alpha \nu \beta 3$ и $\alpha \chi \beta 2$.

Ротавирус обладает свойством, отсутствующим у других безоболочных вирусов, – он проникает в клетку с помощью механизма, аналогичного слиянию мембран. Гидрофобный участок белка VP4 внедряется в *raft*-микродомен билипидного слоя, после чего состоящий из белков VP4 и VP6 наружный слой капсида сбрасывается, и вирусная частица с двухслойным капсидом попадает в цитоплазму. Как уже подчеркивалось, ротавирус раздевается не полностью, и транскрипция происходит внутри двухслойного кап-

сида. В данном случае РНК-полимеразы в составе разных частиц функционируют независимо друг от друга, поэтому мРНК синтезируются не в эквимолекулярном соотношении. Кэпирование ротавирусных мРНК осуществляет гуанилилтрансфераза (белок VP3), молекулы которой расположены под вершинами внутреннего слоя капсида. Ротавирусные мРНК не имеют на 3'-концах поли-А-последовательность, необходимую для их защиты от разрушения и для эффективной трансляции; эту функцию выполняют нетранслируемые участки на 3'-конце мРНК, а также белок NSP3, взаимодействующий с клеточным фактором инициации трансляции eIF-4G. Кэпированные вирусные мРНК выходят из капсида через каналы на вершинах икосаэдра и транслируются в цитоплазме. Ротавирусные белки накапливаются в вириоплазме – компартменте, лишенном мембраны; его образование контролируется белками NSP2 и NSP5. В вириоплазме образуются репликативные интермедиаты, состоящие из мРНК и белков кора (VP1, VP2 и VP3), с помощью которых на мРНК-матрице синтезируется минус-нить РНК. Репликация осуществляется строго согласованно и одновременно всеми 11 полимеразными комплексами, в результате чего образуются геномные сегменты dsРНК. Они одеваются белком VP6, превращаясь в частицы с двухслойным капсидом, готовые приступить к новому раунду репликации или послужить основой для образования зрелых инфекционно-активных вирионов. Во втором случае незрелые вирионы транспортируются к мембранам эндоплазматического ретикулума, где они приобретают промежуточную липидную оболочку с включенным в нее белком NSP4, а затем теряют ее и покрываются наружным белковым слоем капсида, состоящим из белков VP4 и VP7. Инфекционные частицы выходят из клетки либо в результате лизиса, либо путем экзоцитоза, минуя аппарат Гольджи. Размножение ротавируса в клетках занимает не более 10–12 часов. Для эффективной репродукции любого вируса животных необходимо, чтобы инфекция как можно дольше «не замечалась» иммунной системой хозяина.

Представители сем. *Reoviridae*, в частности, ротавирусы, достигают этого с помощью нескольких механизмов:

- 1) вирусный геном никогда не презентуется в цитоплазме – следовательно, не активируется синтез интерферонов I типа через сигнальные пути, включающие в себя рецептор TLR3 и протеинкиназу PKR;
- 2) неструктурные вирусные белки эффективно подавляют сигналинг. У ротавирусов эту функцию выполняет белок NS1, стимулирующий деградацию транскрипционных факторов IRF3, IRF5 и IRF7 в протеасомах.

Для человека наибольшее значение имеют ротавирусы группы А (более 98 % случаев заболевания). Антигенные варианты ротавирусов группы А принято обозначать как G1[P1], G3[P3], G6[P8] и т. д. – в зависимости от сочетания поверхностных белков VP4 и VP7. Как правило, в эпидемический сезон одновременно циркулирует несколько подтипов ротавируса. В основе антигенной изменчивости ротавирусов могут быть мутации (из-за ошибок РНК-полимеразы), РНК-рекомбинация, а также реассортация (т. е. взаимный обмен между сегментами генома). Отмечено, что полимеразы ротавирусов совершают меньше ошибок, чем полимеразы других РНК-содержащих вирусов. Вероятно, это обусловлено устройством вирусных частиц, представляющих собой сложный репликативный комплекс, в составе которого полимеразы действуют согласованно.

Главным механизмом изменчивости ротавирусов, по-видимому, служит реассортация. Она возможна не только между ротавирусами человека, но и между вирусами человека и других млекопитающих. В данном отношении ротавирусная инфекция напоминает гриппозную, однако между ними имеются существенные различия. Во-первых, для человека основным источником новых вариантов ротавирусов служат не птицы, а свиньи. Во-вторых, ротавирусная инфекция вызывает стойкий иммунитет (несмотря на антигенную вариабельность поверхностных белков и гетерогенность популяции циркулирующих штаммов). Как и при многих других вирусных инфекциях, гуморальный (связанный с образованием антител)

ответ на ротавирусную инфекцию начинает развиваться с первых дней заболевания. Вначале в крови появляются антитела класса IgM, затем их титр увеличивается, достигает максимума через 3–4 недели с момента заражения, после чего он снижается. В начале второй недели появляются антитела класса IgG, их титр достигает максимума к концу месяца, после чего они продолжают вырабатываться в течение нескольких лет. Уникальность ротавирусной инфекции состоит в том, что основную роль в защите макроорганизма от заболевания играют IgA, причем важнейшими из них являются антитела к белку промежуточного капсида VP6.

Исследование ротавирусов, важнейших представителей сем. *Reoviridae*, внесло значительный вклад в вирусологию. На этих объектах были изучены такие фундаментальные явления, как уклонение dsРНК-вирусов от иммунного ответа, раскрыт механизм внутриклеточной нейтрализации вирусов антителами, показана тонкая возрастная настройка иммунной системы млекопитающих. Перспективы исследований dsРНК-содержащих вирусов связаны с разработкой систем клонирования сегментированных dsРНК-геномов с помощью методов «обратной» генетики.

1.6.7 Вирусы, содержащие геномную ssРНК(+) и не имеющие стадию обратной транскрипции

Геномная ssРНК(+) инфекционна – после проникновения в клетку она выполняет роль мРНК, которая транслируется с образованием структурных и неструктурных вирусных белков. Репликаза этих вирусов, РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP), не является структурным белком вириона, т. е. она не входит в его состав, хотя кодируется вирусным геномом и не относится к ранним вирусным белкам. Этим ssРНК(+)-вирусы отличаются от прочих РНК-содержащих вирусов – dsРНК-вирусов и ssРНК(+)-вирусов со стадией обратной транскрипции, а также от ssРНК(–)-вирусов, которые содержат этот фермент в составе вириона. Все известные ssРНК(+)-вирусы размножаются в цитоплазме; исходная геномная РНК, репликативные интермедиаты и геномные РНК вирусного потомства не покидают ее пределы. Для сравнения, некоторые ssРНК(–)-вирусы, например, вирусы гриппа и вирус болезни Борна, реплицируются в ядре. RdRP у ssRNA(+)-вирусов, как правило, взаимодействует с внутренними мембранами, в частности, с мембранами модифицированных лизосом, мембранами гладкого эндоплазматического ретикула или мембранами митохондрий. Размножение в цитоплазме и неспособность интегрировать свой геном в геном клетки-хозяина не мешает некоторым из этих вирусов осуществлять персистентную, часто пожизненную инфекцию (примерами служат вирус гепатита С и другие представители сем. *Flaviviridae*). Вирусы, содержащие ssРНК(+), обычно чувствительны к интерферонам I типа (IFN- α и IFN- β), а также к индукторам интерферонов. Это свойство используется при лечении вызываемых ими заболеваний. Исключения составляют персистентные инфекции, с которыми можно бороться при помощи интерферонов, однако такое лечение требует индивидуального подхода, поскольку может обострить болезнь или стимулировать аутоиммунные процессы.

Размер генома ssРНК(+)-вирусов в среднем составляет 7–10 тыс. н. (крайние значения 6–30 тыс. н.). Максимальный размер генома в этой группе (30 тыс. н.) имеют коронавирусы. В соответствии с небольшим размером генома диаметр вирусных частиц также невелик и составляет от 30 нм у безоболочных пикорнавирусов до 100–150 нм у оболочных коронавирусов. Вирусы, содержащие ssРНК(+), широко распространены, причем некоторые из них способны размножаться в клетках разных хозяев – насекомых, птиц и грызунов. Знакомство с ssРНК(+)-вирусами целесообразно начать с проще устроенных безоболочных представителей, геномная РНК которых заключена в белковый капсид. Из-за отсутствия липидов их вирионы не повреждаются органическими растворителями и детергентами. Капсиды таких вирусов образованы либо одним белком, либо несколькими разными белками (чаще всего тремя или четырьмя). Все безоболочные ssРНК(+)-вирусы животных проникают в клетки хозяина путем эндоцитоза. При закис-

лении полости фаголизосомы капсид изменяет свою конформацию и приоткрывается, в результате чего геномная РНК переходит в цитоплазму.

Безоболочные виды ssРНК(+)-вирусов животных относятся к сем. *Astroviridae*, *Caliciviridae* и *Nodaviridae*. Одним из первых хорошо изученных ssРНК(+)-вирусов стал вирус полиомиелита (род *Poliovirus*). Вирусы млекопитающих, сходных с ним по строению, в 1970-е гг. объединили в сем. *Picornaviridae*. Позднее в него был включен ряд вирусов членистоногих и птиц. Однако, как показывают результаты молекулярно-генетического анализа, это семейство неоднородно. Особенности организации генома и цикла репродукции послужили основанием для того, чтобы выделить из него вирусов членистоногих в сем. *Dicistroviridae* и *Iflaviridae*.

В 2008 г. на основе сем. *Picornaviridae* был образован порядок *Picornavirales*. В него вошло восемь семейств: *Bacillariornaviridae* (вирусы фитопланктона), *Caliciviridae* (вирусы млекопитающих), *Dicistroviridae* (вирусы членистоногих), *Iflaviridae* (вирусы членистоногих), *Labyrnnaviridae* (вирусы протистов), *Marnaviridae* (вирусы протистов-паразитов рыб), *Picornaviridae* (вирусы млекопитающих и птиц) и *Secoviridae* (вирусы растений).

Поскольку вирусы сем. *Caliciviridae*, *Picornaviridae* и *Coronaviridae* поражают млекопитающих, рассмотрим их более подробно. Первым в сем. *Caliciviridae* открыт возбудитель везикулярной экзантемы – некогда загадочного заболевания, поразившего в 1932 г. поголовье свиней на животноводческих фермах США и Канады. Вторая его волна пришла на 1950-е гг., после чего оно не возобновлялось. При электронно-микроскопическом исследовании законсервированных образцов инфекционного материала оказалось, что находящиеся в нем вирусные частицы имеют нетривиальную морфологию: в главной проекции они похожи на шестилучевую звезду с чашеобразными поверхностными углублениями. На этом основании данные вирусы были названы калицивирусами.

В 1976 г. сначала в Великобритании, а затем и в других странах в фекалиях детей, больных острым гастроэнтеритом, были обнаружены вирионы вышеописанной морфологии. Сем. *Caliciviridae* содержит четыре основных рода: *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* и *Vesivirus*, которые вызывают геморрагическую болезнь кроликов, кишечные заболевания людей, коров и свиней, а также везикулярную экзантему свиней.

Вирионы калицивирусов выглядят, как округлые частицы диаметром 28–40 нм, поверхность которых усеяна невысокими выступами. Частицы калицивирусов устроены довольно просто: капсид состоит из единственного структурного белка VP1, консервативные внутренние домены которого ответственны за самосборку, а переменные наружные домены связываются с клеточными рецепторами. Частицы калицивирусов дополнительно содержат 2–3 копии белка VP2, необходимого для стабилизации капсида и упаковки РНК. Калицивирусы содержат несегментированную ssРНК(+) размером около 7,5 тыс. н. На 5'-конце находится короткий нетранслируемый участок с ковалентно присоединенным белком VPg. К нему примыкает рамка считывания ORF1, кодирующая неструктурные белки (в том числе геликазу, протеазу и РНК-зависимую РНК-полимеразу). За генами неструктурных белков следуют гены структурных белков капсида. У норовирусов и везивирусов белки капсида кодируются отдельными рамками считывания (ORF2 и ORF3). У лаговиров и саповирусов главный белок капсида VP1 образуется путем расщепления полипротеина, закодированного в первой рамке считывания (ORF1), а минорный белок VP2 кодируется отдельной рамкой считывания (ORF2). За генами капсида расположен небольшой нетранслируемый участок. У калицивирусов 3'-конец геномной РНК полиаденилирован; субгеномная РНК содержит на 5'-конце белок VPg и поли-А-последовательность на 3'-конце.

Вирусные частицы проникают в клетки путем эндоцитоза; в результате снижения рН внутри эндосомы в цитоплазму высвобождаются геномная и субгеномная РНК. На плюс-матрице геномной РНК первоначально образуется полипротеин; затем он фраг-

ментуруется на структурные и неструктурные белки (важнейшие из них – вирусоспецифичная протеаза и RdRP). Инициация трансляции калицивирусов слабо изучена; поскольку их геномная РНК не содержит IRES-последовательностей и неэкспонирована; роль кэпа, видимо, выполняет белок VPg, который связывается с клеточным фактором инициации трансляции eIF-4E. Вирусная RdRP синтезирует репликативный интермедиат (минус-матрицу), на которой образуются комплементарные ей молекулы геномной РНК вирусного потомства. Переключение с транскрипции на репликацию происходит путем взаимодействия специфических последовательностей на 5'- и 3'-концах геномной РНК при участии клеточных факторов. Капсидные белки в основном синтезируются на матрице субгеномной РНК. Капсиды потомства образуются из 180 копий главного белка VP1; в ходе самосборки к ним присоединяется несколько копий минорного белка VP2. Сигналом к упаковке геномной РНК служит связывание с ней «концевого» белка VPg; как синтезируется и упаковывается субгеномная РНК, до сих пор не известно. Функции неструктурных белков калицивирусов изучены также недостаточно.

Название сем. *Picornaviridae* расшифровывается как «очень мелкие РНК-содержащие вирусы». Действительно, это одни из самых мелких вирусов животных: диаметр их частиц в среднем составляет около 30 нм. Размер генома пикорнавирусов также невелик и лежит в пределах 7,0–7,5 тыс. н. К числу пикорнавирусов относятся возбудители таких актуальных заболеваний, как гепатит А (болезнь Боткина), полиомиелит и ящур.

Сем. *Picornaviridae* в настоящее время насчитывает 12 родов вирусов млекопитающих (в том числе человека) и птиц. Отметим наиболее значимые из них: *Aphthovirus* (вирус ящура), *Cardiovirus* (вирус энцефаломиокардит, вирус Тайлера, вирус Сэффолд), *Enterovirus* (энтеровирусы человека, коров, обезьян и свиней), *Hepatovirus* (вирус гепатита А), *Rhinovirus* (острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) у детей и взрослых), *Teschovirus* (тешинская болезнь, тяжелый энцефаломиелит и паралич свиней), *Avihepatovirus* (возбудитель гепатита уток), *Erbovirus* (возбудители острых респираторных заболеваний лошадей), *Kobuvirus* (в частности, вирус Аичи; вызывает гастроэнтериты у жителей Японии), *Parechovirus* (вирусы ЕСНО 22-го и 23-го типа; вызывают детский гастроэнтерит), *Sapelovirus* (возбудители энтеритов птиц и свиней) и *Tremovirus* (агент птичьих энцефалитов), а также ряд других, менее известных родов пикорнавирусов.

Пикорнавирусы образуют безоболочные вирионы; внутри капсида находится плотно скрученная спираль ssРНК, которая ковалентно связана с белком VPg. На негативно контрастированных препаратах они выглядят, как сферические частицы без каких-либо внешних структурных особенностей. В действительности капсиды представляют собой икосаэдры. При снижении рН они изменяют свою конформацию, и тогда на их вершинах обнаруживаются каналы. По строению капсида пикорнавирусы могут несколько отличаться друг от друга, но в целом их частицы устроены сходным образом. Капсид образован четырьмя структурными белками (VP1, VP2, VP3 и VP4) – по 60 молекул каждого. На вершине икосаэдра находится пять молекул белка VP1, образующих пентон. Белки VP2 и VP3 расположены на гранях икосаэдра, а белок VP4 – внутри капсида. Белок VP4 миристилирован, т. е. с его N-концом ковалентно связан остаток миристиновой кислоты. На поверхности капсида вокруг каждой из вершин размещаются вирусные рецепторы. У риновирусов и вируса полиомиелита они находятся в щелевидном углублении; у вируса ящура они представляют собой подвижные белковые петли, выступающие над поверхностью капсида. В непосредственной близости от рецепторов находятся переменные участки капсидных белков, определяющие серотип вируса. На поверхность капсида выступают гидрофильные группы, в результате чего при нейтральном рН вирионы пикорнавирусов несут слабый отрицательный заряд. В свою очередь, гидрофобные участки скрыты внутри капсида, поэтому пикорнавирусы устойчивы к органическим растворителям (эфиру, хлороформу и т. д.), а также к слабым детергентам. Они сохраняют инфек-

ционную активность в кислой среде; наиболее устойчив вирус полиомиелита – его частицы стабильны даже при pH 2.

Детали строения вирионов пикорнавирусов недостаточно изучены. Например, до сих пор неизвестно, все ли вершины капсида функционально эквивалентны (т. е. может ли любая из них служить порталом для выхода геномной РНК). Неизвестно также, какова укладка РНК внутри капсида – упорядоченная или неупорядоченная.

Вирион пикорнавирусов содержит молекулу ssРНК(+) размером около 7440 н., которая связана с белком VPg на 5'-конце и полиаденилирована на 3'-конце. В центральном участке генома расположена открытая рамка считывания, которая кодирует большой полипротеин; после трансляции он расщепляется на структурные и неструктурные белки. К первым относятся белки капсида VP1–VP4 и РНК-связанный белок VPg, ко вторым – РНК-зависимая РНК-полимераза (3Dpol), а также вирусоспецифичные протеазы 2Apro и 3Cpro/3CDpro. На обоих концах геномной РНК находятся нетранслируемые участки. В отличие от эукариотных мРНК, на 5'-конце геномной РНК пикорнавирусов отсутствует m7G-кэп. Его функцию выполняет цисэлемент – IRES, который инициирует трансляцию downstream-участка генома от классического старт-кодона AUG. Трансляция у пикорнавирусов инициируется только в одном локусе геномной РНК, т. е. эта мРНК моноцистронна. Помимо сайта IRES в геномной РНК содержится еще несколько цисэлементов, представляющих собой вторичные структуры (шпильки). Первые 88 нуклеотидов на 5'-конце образуют «клеверный лист»; показано, что такая структура требуется для формирования репликативного комплекса при синтезе плюс-нити РНК на минус-матрице. На 3'-конце расположены две шпильки, образующие псевдоузел; они необходимы для репликации вируса, однако их конкретная функция неизвестна. В области генома, кодирующей белок 2C, находится еще одна шпилька, репликативный цисэлемент; он служит матрицей для полиуридилирования белка VPg в ходе репликации. Как и все ssРНК(+)-вирусы, пикорнавирусы размножаются только в цитоплазме. Репликация геномной РНК и сборка вирионов проходят в цитоплазме, хотя не исключается транспорт регуляторных вирусных белков в ядро. Размножению предшествует адсорбция и проникновение вируса в клетки-мишени; по-видимому, пикорнавирусы интернализируются путем эндоцитоза.

Специфическими рецепторами для пикорнавирусов могут быть разные поверхностные макромолекулы. В частности, рецептором для вируса полиомиелита служит CD155 – трансмембранный гликопротеин из класса иммуноглобулинов. Его нормальной функцией является связь с внеклеточным матриксом и соседними клетками. В норме этот белок присутствует на базолатеральной поверхности клетки и, следовательно, он малодоступен для взаимодействия с вирусными частицами со стороны апикальной поверхности. Поэтому должен существовать механизм для переноса адсорбированных частиц в область расположения рецепторов; в частности, он известен у вируса *Coxsackie B*, который использует для своего проникновения рецептор CAR. На апикальной поверхности клетки вирион связывается с белком DAF, что приводит к агрегации молекул последнего и транспорту образовавшегося комплекса в зону плотного контакта между латеральными поверхностями клеток – туда, где локализован рецептор CAR. Специфическое связывание полиовируса с клеточным рецептором CD155 приводит к поглощению вириона путем неканонического эндоцитоза, не зависящего от клатрина и кавеолина.

В отличие от полиовируса, риновирусы используют рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR), а также фактор межклеточной адгезии (ICAM-1). Они проникают в клетки путем клатрин-опосредованного эндоцитоза и оказываются в ранней эндосоме. Как уже отмечалось, при снижении pH в эндосомах вирион претерпевает конформационное изменение: высвобождается внутренний миристилированный белок VP4 и на поверхности частицы экспонируются гидрофобные участки белка VP1. В результате этого вирионы прикрепляются к внутренней поверхности мембраны эндосомы и инъецируют

геномную РНК в цитоплазму. Пустые капсиды направляются в лизосомы, где разрушаются протеазами. В цитоплазме от геномной РНК отщепляется белок VPg, что служит сигналом к началу кэп-независимой трансляции с участием элемента IRES.

Инициация трансляции геномной РНК пикорнавирусов происходит иначе. К элементу IRES присоединяется несколько клеточных факторов кэп-связывающего комплекса, а также дополнительные белки ITAF. Клеточные факторы инициации трансляции, в частности eIF-4G, модифицируются вирус протеазами. Затем к инициаторному комплексу поочередно присоединяются субъединицы рибосомы, начинается трансляция. Таким образом, элемент IRES напрямую не взаимодействует с рибосомой, а только способствует образованию инициаторного комплекса. Трансляция геномной РНК пикорнавирусов начинается так же, как трансляция клеточных мРНК, со старт-кодона AUG, расположенного на некотором расстоянии от инициаторного комплекса. В результате трансляции геномной РНК образуется полипротеин-предшественник, который при помощи кодируемых вирусом протеаз (2Argo и 3Cpro/3CDpro) расщепляется на структурные и неструктурные белки. Протеолиз проходит в несколько этапов; интермедиаты не всегда имеют те же функции, что и конечные продукты. Одновременно с началом синтеза вирусных белков вирусная протеаза 2Argo расщепляет комплекс клеточных факторов инициации трансляции, что приводит к подавлению кэп-зависимой трансляции клетки-хозяина. Видоизмененный фактор eIF-4G, совместно с белками ITAF, участвует в инициации трансляции вирусных РНК, но они не способны образовывать инициаторный комплекс для трансляции клеточных мРНК. Вирус подавляет хозяйскую транскрипцию. Вирусная протеаза 3Cpro проникает в ядро, где она инактивирует клеточные факторы – TFIIIC и TATA-связывающий белок (TBP). Из структурных белков VP0, VP1 и VP3 в цитоплазме формируются капсиды для упаковки вирусной РНК.

При расщеплении полипротеина-предшественника также образуются неструктурные белки, в том числе RdRP (3Dpol), которая синтезирует минус-матрицу на геномной РНК(+), в результате чего образуется репликативный интермедиат – короткоживущая dsРНК. Затем RdRP создает на минус-матрице многочисленные плюс-копии. Они могут использоваться как для синтеза вирусных белков, так и в качестве геномной ssРНК(+) потомства. Для синтеза плюс-копий на минус-матрице необходим праймер – уридилированный белок VPg (VPg-pU-pU).

Одно время считали, что для уридилирования используется последовательность поли-А на 3'-конце геномной РНК, однако позднее выяснилось, что белок VPg уридилируется за счет последовательности AAA, расположенной на конце шпильки элемента CRE гена белка 2C. Геномная РНК реплицируется в особых структурах, образованных на основе мембран гладкого эндоплазматического ретикулума и вирусных белков 2C и 2BC. В инфицированных клетках содержится в 50 раз больше плюс-копий РНК, чем минус-копий. Сигналом к инкапсидированию дочерних плюс-копий РНК служит присоединение к ним белка VPg; без этого упаковка невозможна. За упаковкой следует созревание вириона: капсидный белок VP0 расщепляется на белки VP2 и VP4, капсид приобретает окончательную форму, и вирусная частица становится инфекционной.

Пикорнавирусы в основном используют рецепторы, обеспечивающие межклеточные контакты и связь клеток с внеклеточным матриксом. Они представлены на поверхности клеток многих типов, в первую очередь на эпителиальных клетках.

Пикорнавирусы так же, как и прочие РНК-содержащие вирусы, эффективно приспособляются к изменению условий существования. Свойство РНК-полимераз совершать на три-пять порядков больше ошибок, чем ДНК-полимеразы, способствует тому, что вирусная популяция становится генетически гетерогенной. В период болезни вирус проходит несколько циклов размножения, в результате чего появляются варианты, которые по биологическим свойствам иногда значительно отличаются от исходного. Как уже

отмечалось, популяционная изменчивость такого вируса в пределах организма хозяина характеризуется понятием «квазивид».

Другим эффективным механизмом изменчивости пикорнавирусов является рекомбинация геномной РНК между их циркулирующими вариантами. В большинстве случаев инфекция не сопровождается ярко выраженными клиническими проявлениями и индуцирует слабый иммунный ответ, что приводит к продолжительному заболеванию (вирус в организме обнаруживается на протяжении 2–3 месяцев). Многие пикорнавирусы процветают, эффективно преодолевая иммунитет, обусловленный антителами.

Широкое распространение риновирусов связано с их изменчивостью – во время эпидемии одновременно может циркулировать несколько десятков серотипов. В свою очередь, стратегия ухода энтеровирусов от иммунного ответа основана на их относительно вялой репликации в кишечнике, благодаря чему защитная реакция организма хозяина запаздывает и она ниже по интенсивности. Пикорнавирусы не ограничиваются преодолением популяционного иммунитета. Некоторые из них активно подавляют систему приобретенного иммунитета и связанный с ней межклеточный сигналинг.

Coronaviridae – это группа вирусов (более 40 видов), из которых в настоящее время семь видов:

- ✓ имеют медицинское значение;
- ✓ являются природно-очаговыми инфекциями;
- ✓ вызывают патологические процессы у человека инфекционной этиологии;
- ✓ протекают клинически разнообразно с мультисистемной патологией и с разной степенью тяжести;
- ✓ развиваются эпидемиологические процессы среди человеческой популяции;
- ✓ разные виды коронавирусов имеют неодинаковый характер распространения и инфицирования среди людей – некоторые виды относят к группе спорадических инфекций, другие виды обладают способностью к эпидемическому (и даже пандемическому) распространению.

Название вируса обусловлено их электронно-микроскопической характеристикой. Их форма напоминает корону (пепломеры создают вокруг оболочки вирионов выраженное зубчатое обрамление, подобное короне).

Впервые коронавирус выделили А. Ф. Шалк и М. С. Хоун (1931). Они идентифицировали его как вирус инфекционного бронхита у цыплят, в настоящее время носит название «коронавирус птиц». В последующие годы и десятилетия было открыто множество различных по происхождению видов коронавирусов, выделенных от млекопитающих и птиц, но только в 1968 г. их объединили в группу *Coronavirus*.

В 1971 г. группа коронавирусов получила таксономический ранг – род, а в 1976 г. – таксономический ранг повысился до семейства. Дальнейшее совершенствование классификации коронавирусов происходила на основании белков, описанных у вирусов, их строения. В начале XXI в. стали выявлять новые вирусы, вызывающие заболевания в виде эпидемических проявлений не только у различных млекопитающих и птиц, но и у людей. Так, например, в 1965 г. впервые у людей обнаружен коронавирус HCoV 229E, вызывающий заболевание – коронавирус человека 229E. В 1966 г. у людей выделили коронавирус HCoV OC43 – коронавирус человека OC43. Необходимо подчеркнуть, что заболевания, вызванные обоими вирусами, протекали с легкими клиническими проявлениями по типу острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). В 2002 г. в Южном Китае появились неизвестные заболевания, вызывающие атипичную пневмонию, которая в дальнейшем распространилась в разные страны и на разные континенты, а затем вызвала эпидемию. Специальные вирусологические и молекулярно-генетические исследования установили этиологическую причину заболевания, которое было связано с неизвестным коронавирусом SARS-CoV, вызывающим заболевание – тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС). Голландские ученые (2004 г.) при исследовании матери-

ала, забранного от человека с клиникой ОРВИ, выделили неизвестный коронавирус HCoV-NL-63, вызывающий заболевание – коронавирус человека NL63. Сотрудники Гонконгского университета позднее (2005 г.) обнаружили в материале от больного с клиническими проявлениями двухсторонней пневмонии другой новый коронавирус – HCoV HKU1, вызывающий заболевание – коронавирус человека HKU1. Тем не менее, заболевания, вызванные обоими вирусами, клинически протекали подобно болезням, ранее описанные в легкой форме, сопровождающимися симптомами ОРВИ. В редких случаях эти виды вызывали заболевания, клинически протекающие как тяжелый синдром атипичной пневмонии.

В Саудовской Аравии (г. Джидда, 2012 г.) при исследовании назофарингеального смыва, взятого от мужчины с ОРВИ, выделен новый вирус MERS-CoV, вызывающий клинически ближневосточный респираторный синдром (БВРС) и обладавший способностью к эпидемическому распространению в мире.

В г. Ухань (провинция Хубэй, Китай, 8 декабря 2019 г.) официально зарегистрирован первый случай заболевания человека, вызванный неизвестным возбудителем.

31 декабря 2019 г. из средств массовой информации стало известно, что городская комиссия здравоохранения представила первый официальный отчет в Министерство здравоохранения (Пекин, Китай) о появлении на территории города заболеваний, которые регистрировалась как «атипичная пневмония неясной этиологии».

7 января 2020 г. был идентифицирован новый вирус, относящийся к сем. *Coronaviridae* и получивший временное название 2019-nCoV. 10 января 2020 г. расшифрован его геном и депонирован в Genbank.

30 января 2020 г., вначале в г. Ухань, а затем на других территориях Китая и в некоторых близко расположенных странах, при большом количестве инфицированных людей и летальных случаев заболевания, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила происходящее вызванным вспышкой вируса 2019-nCoV.

12 февраля 2020 г. ВОЗ присвоило заболеваниям, которые вызывает вирус 2019-nCoV, новое название – COVID-19.

11 марта 2020 г., в связи с расширением географического масштаба распространения эпидемии и заболеваний, зарегистрированных на большинстве континентов и почти во всех странах мира, вызванных COVID-19, объявлена пандемия.

К концу первого десятилетия XXI века начала оформляться современная классификация коронавирусов: образовался род *Coronavirus* в составе сем. *Coronaviridae* и подсем. *Orthocoronavirinae*. Разделение на более низкие таксономические категории – роды, подроды, виды – произошло позднее после детального изучения вирусов и их клеточных рецепторов, которые не были связаны с их различиями у видов биологических объектов (люди, млекопитающие, птицы).

Коронавирусы 1-й группы используют N-аминопептидазу в качестве клеточного рецептора, известного как кластер дифференцировки CD13. В данной группе выделяют две подгруппы 1А и 1В, различающиеся структурой 3' концевой части генов. Подгруппа 1А включает вирусы млекопитающих и птиц (абсолютно идентичны), а подгруппа 1В – вирусы человека (HCoV-229E, HCoV-NL63), млекопитающих и птиц (разнятся рамкой считывания).

Коронавирусы 2-й группы подразделялись на 2А-, 2В-, 2С-подгруппы. Вирусы 2А-подгруппы исследователи включали два разных клеточных рецептора: в 1-ю – молекулу клеточной адгезии, ассоциированную с раково-эмбриональным антигеном 1-го типа, являющимся маркером CD66a; во 2-ю – молекулу N-ацетил-9-О-ацетилнейроминовой кислоты, включающую вирус, вызывающий у людей заболевание HCoV-HKU1. Специфичность этой классификационной группы определялась наличием гликопротеина гемагглютинин-эстеразы, аффинной к сиалозидам. Вирусы 2В-подгруппы специфически связывались с ангиотензин-превращающим ферментом 2-го типа; дополнительно их объединяла

близость по концевым генам RdRp, Hel, N. В эту подгруппу входили вирусы, также вызывающие заболевания у людей HCoV-NL-63, SARS-CoV, SARS-CoV-2. Вирусы 2С-подгруппы обладали рецептором (дипептидипептидаза 4-го типа, которая являлась маркером CD26 и определялась у вируса MERS-CoV), имеющим медицинское значение.

Коронавирусы 3-й группы дифференцировалась на три подгруппы вирусов из-за различий в структуре 3' концевого набора генов. Подгруппа 3А включала вирусы, которые держали рамки считывания для двух неструктурных белков; подгруппа 3В – содержала вирус и имела рамки считывания для трех неструктурных белков; подгруппа 3С, в которую входили вирусы, обладающие рамкой считывания для более трех неструктурных белков между генами S и E. Эта группа объединила коронавирусы млекопитающих и птиц.

Сложившаяся таксономическая структура коронавирусов оказалась мозаичной, что потребовало изменения в классификации в сторону повышения ранга таксонов. Предложение реализовалось в IX Таксономическом каталоге ICTV (2011 г.): род *Coronavirus* перешел в категорию подсем. *Coronaviridae*. Вместо рода *Coronavirus* описано четыре новых рода, обозначенные буквами латинского алфавита: первый род – *Alphacoronavirus* (1-я группа), второй род – *Betacoronavirus* (2-я группа), третий род – *Gammacoronavirus* (3-я группа с подгруппами 3А и 3В), четвертый род – *Deltacoronavirus* (3-я группа с подгруппой 3С).

В 2018 г. таксономические структуры коронавирусов подверглась еще двум существенным изменениям. Во-первых, введена новая таксономическая категория у коронавирусов – подрод, проведена математическая оценка некоторых рангов (подрод, род, семейство). В основу разделения на подроды и другие таксономические категории было положено выделение филогенетических дистанций (сумма различий по совокупности признаков между двумя узлами филогенетического дерева, измеренная вдоль соединяющих их ребер), построенная на основе изучения полноценных геномов. Во-вторых, произошла замена двух подсемейств на одно, которое получило название *Orthocoronavirinae*. Исследователями установлено, что подсемейство связано с крылатыми животными, являющиеся резервуаром коронавирусов: рукокрылые – для родов *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus*, птицы – для родов *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Это является результатом расширения у коронавирусов спектра резервуара хозяев вследствие их широкой экологической пластичности, что позволило некоторым HCoV вызывать заболевания у людей, показав их эпидемиологическое значение. В род *Alphacoronavirus* входят два подрода, в каждый входит по одному виду коронавирусов, имеющих медицинское значение: подрод *Davinalovirus* включает вид HCoV 229E, подрод *Setracovirus* – вид HCoV NL63. В род *Betacoronavirus* входят пять видов коронавирусов, имеющих медицинское значение, которые разделены на три подрода: в подрод *Embecovirus* входят два вида HCoV HKU1, HCoV OC43; подрод *Merbecoronavirus* включает один вид MERS-CoV; подрод *Sarbecovirus* содержит два вида: SARS-CoV и SARS-CoV-2.

Кроме видов HCoV, выделенных от людей, в роды *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus* входят и другие виды HCoV. Видовые названия HCoV, которые не вызывали заболевания у людей, получены от видовых названий тех млекопитающих и птиц, от которых выделены (кошек, собак, свиней, хорьков, норок, летучих мышей разных видов, мышей, крыс, крупного рогатого скота и др.).

Эпидемическое распространение в человеческой популяции получили вирусы SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, которые вызвали крупные эпидемии, а SARS-CoV-2 – и пандемию. Все коронавирусы, независимо от того, каковы тяжесть течения заболевания, клинические симптомы, какая степень эпидемиологической опасности существует для окружающих, обладают одинаковыми морфологическими свойствами и структурой, хотя некоторые отличия существуют у определенных видов.

Вирионы HCoV сферической формы в диаметре от 80 до 229 нм – самые крупные среди РНК-вирусов. РНК имеет спиральную симметрию, располагается внутри нуклеопротеина (N-белка), и обе структуры вместе формируют нуклеокапсид. На наружной по-

верхности нуклеокапсида находится суперкапсидная оболочка сложного строения (бислойная липидная оболочка), под которой располагаются четыре или пять структурных белков, которые формируют внешний слой коронавируса и защищают РНК, находящуюся внутри. Структурные белки определяют не только структуру вируса, но и принимают участие в репликации новых вирусных частиц, в сборке и выходе из клетки хозяина новых копий вируса. N-белок по химической структуре является фосфорилированным белком и защищает РНК-вирус, сохраняя его в устойчивом состоянии внутри вирусной оболочки, при этом большое количество белков соединяются друг с другом в длинную спираль, обертываясь и наматываясь на РНК.

S-белок располагается на поверхности билипидной оболочки вируса в виде булавоподобных отростков, поэтому называется «спайковый белок», что придает вирусу неповторимую форму короны. S-белок по химической структуре – гликопротеин, создающий тримеры в виде пепломеров, формирующие «зубцы короны» длиной 10–25 нм. Эти протенины коронавируса, обеспечивающие проникновение вируса в соматическую клетку, и определили название таксономической группы вирусов. Часть шипа может расширяться и присоединяться к разным белкам у разных видов, которые присутствуют на клетках дыхательных путей и в клетках других органов и тканей разных систем человека (определяют адгезию и внедрение вируса в клетку). Вероятно, произошедшая некоторое время назад мутация или несколько мутаций повлияло на эволюцию вируса, что создало условия для перехода его от рукокрылых на человека и определило возможность шипам плотно связываться с клетками человека.

M-белок – мембранный, структурный белок HCoV находится немного глубже спайкового белка, ближе к нуклеокапсиду, является трансмембранным белком, по химической структуре гликопротеин. M-белок является частью внешней оболочки вируса и обеспечивает форму вириона. Исследования, проведенные с помощью криоэлектронной микроскопии и томографии, показали, что существуют две функционально отличные формы M-белка коронавируса. На большинстве вирусных частиц M-белок плотно упакован по краю, а у некоторых характеризуется как размытый, который не вступает в контакт с РНК. Общую форму, плотно упакованную по краю, назвали M LONG, а короткую размытую – M COMPACT. Вирусные шипы находились как на M LONG, так и на M COMPACT, но отсутствовали на мембранах вируса без M-белка. Две формы M-белка представляли разные конформации одной и той же пептидной цепи. Эндодомены M-белка самостоятельно собирались в олигодимерные комплексы при 37 °С, при этом формировалась выпуклая, жесткая вирусная оболочка, которую назвали M LONG. M LONG стабилизировался белками S, N и E. M-белок – это димерный белок, который контролирует размер частиц и эффективность сборки.

E-белок, оболочечный структурный белок, примыкает к нуклеокапсиду, который выявляется только среди вирусов подсем. *Orthocoronavirinae*. E-белок помогает сформировать маслянистый пузырек вируса и выполнить функции, находясь уже внутри инфицированной клетки. Пентамеры E-белка формируют ионные каналы и представляют собой важный фактор патогенности HCoV (в оболочке нескольких копий пентамеров на вирион). E-белок встроен в оболочку, может соединяться с белками, помогающими регулировать гены, активно изменять паттерн активации собственных генов человека и участвовать в сборке вириона и выходе вириона за пределы клетки.

У некоторых коронавирусах (HCoV-OC43 и HCoV-NKU1) находится еще дополнительно поверхностный гемагглютинин-эстераза (HE-белок), по химической структуре гликопротеин. Вирусы, обладающие HE-белком, имеют гемагглютинирующую и эстеразную активности, которые используют в качестве механизма вторжения в соматическую клетку, помогают в прикреплении и разрушении определенных рецепторов сиаловой кислоты, которые находятся на поверхности клетки-хозяина. HE-белок представляет собой димер трансмембранного белка, состоящий из двух мономеров, где каждый состоит из

трех доменов. Эти три области являются связывающими доменами: слияние мембран, эстеразы и рецепторов. У всех особо опасных вирусов SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 HE-белок отсутствует. Все структуры вирусной клетки детерминированы генами вируса, которые имеют некоторые отличия у разных вирусов, и определяют процесс изменчивости вирусов и репликацию. Коронавирус относится к группе РНК-вирусов, довольно сложный геном которых зашифрован в очень длинной молекуле РНК. Проникая в клетки-хозяева, вирус реплицирует геномную РНК и создает множество более мелких, называемых субгеномными. Эти субгеномные РНК используются для синтеза различных белков, из которых строятся элементы новых вирусных частиц: шипов, оболочек, мембран.

Биологам из Центра исследований РНК Института фундаментальных наук Южной Кореи под руководством профессоров Ким Харри и Чан Хъешик, в сотрудничестве с Корейским национальным институтом здоровья (КНИИ), удалось детально проанализировать архитектуру генома. Исследователи экспериментально подтвердили наличие в геноме коронавируса 9 из 10 ранее известных субгеномных РНК (входящих в структуру вирусных частиц и транслирующихся в конкретные вирусные белки), а также обнаружили десятки неизвестных, образующихся на разных этапах жизненного цикла вируса в результате слияния и разложения. Кроме того, они выяснили, где именно находятся эти гены на геномной РНК. Вирион коронавируса белками-шипами связывается с рецептором клетки-хозяина, затем вирус проникает в клетку, а оболочка отслаивается, что позволяет геномной РНК присутствовать в цитоплазме. РНК ORF1a и ORF1b создаются геномной РНК и затем транслируются в белки pp1a и pp1ab соответственно. Белки pp1a и pp1ab расщепляются протеазой с образованием 16 неструктурных белков. Некоторые неструктурные белки образуют комплекс репликации/транскрипции RdRp (РНК-зависимая РНК-полимераза), которые используют геномную позитивную цепную РНК в качестве матрицы. Геномная позитивная РНК, продуцируемая в процессе репликации, становится геном новой вирусной частицы. Субгеномные РНК, полученные в результате транскрипции, транслируются в структурные белки: S-белок шипа, E-белок оболочки, M-белок мембраны и N- нуклеокапсидный белок, которые образуют вирусную частицу. Белки шипа, оболочки и мембраны входят в эндоплазматический ретикулум, а белок нуклеокапсида объединяется с нитью геномной позитивной РНК, превращаясь в нуклеопротеиновый комплекс. Они сливаются в полную вирусную частицу в отсеке эндоплазматического ретикулума – аппарата Гольджи и выводятся во внеклеточную область через аппарат Гольджи и везикулу.

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, затронула страны с суммарным населением в миллиарды человек. Число инфицированных уже превысило 30 млн, а число погибших – 1 млн человек.

Лекарственные препараты направлены на блокирование ферментов, необходимых для жизненного цикла вируса (таких как компоненты репликационного комплекса и вирусные протеазы) и против различных аспектов патогенеза, вызываемого данным вирусом, в частности, «цитокинного шторма», или коагулопатии. Были проделаны попытки использовать плазму крови переболевших, поскольку там находятся антитела, нейтрализующие COVID-19, однако широкого применения данная терапия не получила. Против COVID-19 разработаны вакцины, среди которых Pfizer/BioNTech, Moderna, AstraZeneca, Johnson&Johnson, Sinopharm и Sinovac (19 августа 2021 г.), одобренные для применения ВОЗ.

1.6.8 Вирусы животных, содержащие геномную ssРНК(–)

Представители этой группы вирусов характеризуются рядом общих особенностей строения и репродукции:

1. Геномная минус-РНК не используется в качестве мРНК, т. е. она не может непосредственно транслироваться. Различие между геномной нуклеиновой кислотой ssРНК-содержащих вирусов обусловлено не только ее полярностью (+ или –), но и ее вторичной структурой, что определяет специфику действия регуляторных элементов.

2. У вирусов, содержащих ssРНК(–), в состав вириона входят РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRP) и вспомогательные белки, необходимые для ее функционирования. У вирусов с несегментированным геномом в составе вириона имеется 1–2 полимеразных комплекса, в то время как у вирусов с сегментированным геномом число таких комплексов равно числу сегментов.
3. Первым этапом в цикле репродукции является транскрипция, т. е. образование вирусных мРНК на матрице геномной РНК. РНК-полимеразы вирусов, содержащих геномную ssРНК, различаются между собой по способности кэпировать мРНК. В частности, РНК-полимеразы парамиксовирусов (сем. *Paramyxoviridae*) самостоятельно кэпируют свои мРНК. В свою очередь, полимеразы вирусов гриппа (сем. *Orthomyxoviridae*) используют кэпы мРНК хозяина. Наконец, полимеразы хантавирусов (сем. *Bunyaviridae*) «подбирают» в цитоплазме кэпы хозяина, не подвергшиеся деградации в ходе обновления мРНК.
4. Все известные вирусы животных, содержащие ssРНК(–), являются оболочными.

У вирусов, содержащих ssРНК(–), геном сегментирован или несегментирован. Сегментированный геном имеют представители сем. *Arenaviridae*, *Bunyaviridae* и *Orthomyxoviridae*. Вирусы этих семейств образуют мРНК с использованием хозяйских кэпов. Представители сем. *Arenaviridae* и *Bunyaviridae* репродуцируются в цитоплазме, а представители сем. *Orthomyxoviridae* – в клеточном ядре. Вирусы с несегментированным геномом объединяются в порядок *Mononegavirales*, к которому относятся сем.: *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*. Вирусы этого порядка репродуцируются в цитоплазме, за исключением представителей сем. *Bornaviridae* и некоторых вирусов растений, которые размножаются в клеточном ядре. К сем. *Orthomyxoviridae* принадлежат вирусы, поражающие слизистые оболочки, в том числе вирусы гриппа, вируса парагриппа и вируса кори, первоначально объединяли в это семейство. Затем вирусы гриппа, которые по морфологии и молекулярным свойствам значительно отличаются от вирусов парагриппа и кори, были обособлены в сем. *Orthomyxoviridae*. Все представители сем. *Orthomyxoviridae* имеют геном из 6–8 сегментов ssRNA(–), репродуцируются в ядре и при кэпировании мРНК используют клеточные кэпы (механизм «*cap snatching*»). Сем. *Orthomyxoviridae* относительно невелико и представлено в основном вирусами гриппа, разделенными на три рода – *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* и *Influenzavirus C*. Особенности сем. *Orthomyxoviridae* мы рассмотрим на примере вида *Influenza A virus* (вирус гриппа А).

Судя по эпиграфическим памятникам, гриппом болели еще в Древнем Египте. «Отец» медицины Гиппократ в 412 г. до н. э. описал симптомы заболевания, соответствующего современному гриппу. В конце XV в. во время междоусобной войны Алой и Белой Розы эпидемия «английской потовой горячки» охватила противоборствующие армии, локально вызвав 90-процентную смертность. Эпидемии гриппа охватывали Британские острова в 1506, 1518, 1529 и 1530 гг., тогда же возбудитель проник в Европу. Во время эпидемии 1729 г. в больших европейских городах от гриппа умерло по 50–100 тыс. человек. В 1742–1743 гг. очагом гриппозной пандемии стал Апеннинский полуостров – тогда же болезнь была названа «инфлюэнцей». Свое современное название грипп получил в 1850 г. во время глобальной эпидемии (пандемии), охватившей Европу, Азию и Африку. Особенно тяжелой была пандемия гриппа-«испанки», начавшаяся весной 1918 г.

Вирионы вируса гриппа А (диаметр 100–120 нм) покрыты «шипами» поверхностных рецепторов. Помимо округлых частиц при выходе из клетки в результате отпочкования могут образовываться нитевидные вирионы длиной до нескольких микрометров. Для вирионов вируса гриппа птиц характерна округлая форма, а для вирионов вирусов гриппа человека и свиньи – нитевидная (примером служит пандемический вирус «свиного» гриппа pH1N1/2009). Неизвестно, имеет ли нитевидная форма вириона какое-то значение для инфекционного процесса. Возможно, это дает преимущество тем вирусам, которые

размножаются в легких (в то время как вирусы гриппа птиц репродуцируются в кишечнике) – нитевидные частицы способны заражать клетки мелких бронхиол, что способствует быстрой диссеминации вируса. Вирионы окружены мембранной оболочкой, в основе которой находится фрагмент билипидного слоя, «заимствованный» у клетки-хозяина.

Оболочку вирионов пронизывают рецепторные белки – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). Молекула гемагглютинина состоит из трех идентичных субъединиц, молекула нейраминидазы – из четырех. НА склеивает между собой (агглютинирует) эритроциты, что объясняет название этого белка. Он адсорбируется на остатках сиаловых (N-ацил-нейраминовых) кислот в составе мембранных гликопротеинов и способствует слиянию вирусной мембраны с мембраной эндосомы. В свою очередь, НА разрушает муциновый слой, что облегчает доступ вирусных частиц к поверхности эпителиальных клеток, а также отщепляет остатки сиаловых кислот от мембранных гликопротеинов, способствуя отпочкованию вирусного потомства. НА и НА заякориваются в оболочке вириона благодаря гидрофобно-гидрофильным взаимодействиям с ее липидными и белковыми компонентами (трансмембранный домен НА в основном состоит из неполярных аминокислот, тогда как в наружной глобулярной «головке» преобладают полярные аминокислоты). Помимо гидрофобно-гидрофильных взаимодействий, существенную роль в стабилизации вирусных рецепторов играет связь цитоплазматических доменов НА и НА с матриксным белком М1, выстилающим изнутри оболочку вириона. Кроме НА и НА в состав оболочки вируса гриппа А входит несколько молекул матриксного белка М2, образующих протонный канал. Внутри вириона находится генетический материал – восемь рибонуклеопротеиновых сегментов (РНП). Каждый из них состоит из молекулы ssРНК(–), стабилизированной РНК-связанным «ядерным» белком, и полимеразного комплекса (белки РВ1, РВ2 и РА). Сегменты имеют разную длину в зависимости от размера молекулы РНК, которая содержит спаренные основания на одном конце и шпильку на другом. Безотносительно конфигурации вириона (округлой или нитевидной) он содержит только один комплект сегментов. Сегменты образуют пучок, в котором один из них занимает центральное положение, а другие его окружают. В состав вирионов также входит белок Nер, отвечающий за выведение геномов вирусного потомства из ядра клетки.

Частицы вирусов гриппа А и В устроены в целом сходно и содержат по восемь геномных сегментов; различие между ними заключается в том, что роль протонного канала у вируса гриппа В выполняет белок ВМ2, не чувствительный к ремантадину. Вирус гриппа С имеет не восемь, а только семь геномных сегментов, и не содержит нейраминидазу, отсутствие которой компенсируется многофункциональным белком НЕФ, который отвечает за прикрепление вирусных частиц к клеткам-мишеням, отщепление остатков нейраминовых кислот и слияние мембраны вириона с мембраной эндосомы. Как уже упоминалось, геном вируса гриппа А состоит из восьми сегментов; на 3'-конце и 5'-конце он содержит взаимно комплементарные последовательности, за счет которых образуются большие шпильки. Предполагается, что РНК-полимеразные комплексы присоединяются к основанию каждой такой шпильки. Отдельные сегменты генома вируса гриппа кодируют по 1–2 белка. Вирусные мРНК транскрибируются с соответствующих сегментов вирусной полимеразой; мРНК для белков М2 и Nер образуются в результате альтернативного сплайсинга. Все белки, за исключением NS1 и РВ1-F2, являются структурными; белок РВ1-F2 имеется не у всех вирусов гриппа, его синтез обеспечивается присутствием внутренней рамки считывания в гене РВ1.

Онтогенез вируса гриппа начинается с адсорбции вирионов на клеточной поверхности. Мишени «узнаются» благодаря специфическому взаимодействию между НА и сиаловыми кислотами на поверхности эпителия верхних отделов дыхательных путей. Затем частицы вируса проникают в клетки хозяина путем эндоцитоза, причем вирус гриппа использует как клатрин-опосредованный эндоцитоз, так и эндоцитоз, не зависящий от клатрина или кавеолина. Поскольку сиаловые кислоты входят в состав очень многих мембранных гликопротеинов, сложилась парадоксальная ситуация – клеточные рецепторы,

ответственные за проникновение вируса гриппа, одного из самых изученных вирусов, до сих пор неизвестны. Предполагается, что ими могут быть рецепторы липопротеинов высокой и низкой плотности, соответственно HDLR и LDLR. Содержимое эндосомы закисляется с помощью протонной помпы (V-АТФазы); при $pH \leq 5,5-6,0$ изменяется конформация НА, и на его поверхность выдвигаются «пептиды для слияния», которые внедряются в мембрану эндосомы. Благодаря кооперации нескольких комплексов НА оболочка вириона сливается с мембраной эндосомы. Однако для высвобождения вирусного генома недостаточно, чтобы pH внутри эндосомы снизился – необходимо, чтобы он снизился еще и внутри вириона, что происходит благодаря присутствию протонного канала (его образует белок М2). В результате закисления полости вириона связь РНП с матриксным белком М1 нарушается, и геном вируса высвобождается в цитоплазму.

Сегменты генома вируса гриппа содержат множественные сайты ядерной локализации, которые обеспечивают таргетинг в ядро. Там вирусные РНК-полимеразы, ассоциированные с каждым сегментом, синтезируют вирусные мРНК. Кэпирование осуществляется с использованием хозяйских кэпов, которые отщепляются от клеточных пре-мРНК под воздействием РВ1-субъединицы полимеразного комплекса (она обладает эндонуклеазной активностью). В качестве праймера для синтеза вирусных мРНК используются нетранслируемые участки на 3'-концах геномных сегментов. Сигналами для терминации транскрипции, а также для полиаденилирования мРНК служат поли-U последовательности на 5'-концах геномных РНК. Вирусные мРНК, кодирующие белки М2 и Nер, подвергаются сплайсингу (необходимость в нем – одна из причин того, почему вирус гриппа реплицируется в клеточном ядре). Готовые вирусные мРНК выходят в цитоплазму и там транслируются, причем в первую очередь образуется ранний белок NS1, закодированный в самом коротком сегменте. Затем он димеризуется и в таком виде функционирует в качестве антагониста клеточного сигналинга, подавляя иммунный ответ хозяина. Вновь синтезированные вирусные белки NP и Nер доставляются в ядро. Белок NP участвует в работе вирусных репликаз и образовании РНП вирусного потомства. Белки PA, PB1 и PB2 также поступают в ядро (белок PB2 – отдельно, а белки PA/PB1 – в виде гетеродимера).

Окончательная сборка новых полимеразных комплексов происходит в ядре (перед этим часть молекул белка М1 фосфорилируется и за счет «Zn-finger»-мотива связывает катионы Zn^{2+}). При достижении определенной концентрации белка NP вирусные полимеразы переключаются с транскрипции на репликацию. Вначале образуется репликативный интермедиат – некэпированная и неполиаденилированная ssРНК(+), на которой затем синтезируется комплементарная ей ssРНК(-) вирусного потомства. Сегменты генома переносятся из ядра в цитоплазму при помощи клеточных транспортных белков-экспортинов, а также при помощи вирусного белка Nер и Zn-содержащей формы белка М1. Вирусные гликопротеины НА и NA подвергаются посттрансляционному процессингу в аппарате Гольджи, гликозилируются и экспонируются на цитоплазматической мембране в виде островков, ассоциированных с raft-микродоменами. Тетрамерный белок М2 подвергается процессингу в аппарате Гольджи, где он выполняет важную функцию – повышает pH в его цистернах, что стабилизирует структуру НА.

Сборка вирионов происходит на клеточной мембране. С цитоплазматическими доменами НА и NA связывается белок М1 (в форме без Zn^{2+}), затем к ним прикрепляется РНП вирусного потомства, что служит сигналом для начала отпочкования. Как уже отмечалось, форму частиц (округлые либо нитевидные) в основном определяет белок М1. Нитевидные частицы при отпочковании захватывают из цитоплазмы некоторое количество актина. NA отщепляет остатки сиаловых кислот от гликопротеинов, расположенных на участке отпочкования; вирусная частица отделяется от клеточной мембраны и окончательно созревает, превращаясь в инфекционно-активный вирион. Этап созревания заключается в расщеплении пре-НА на две субъединицы (НА1 и НА2), в результате чего белок

НА приобретает функционально активную конформацию. Процессинг пре-НА осуществляется разными протеазами. Частицы вирусного потомства выходят из клетки уже инфекционно-активными. У низкопатогенных штаммов пре-НА расщепляется вне клетки трипсиноподобными экзопропротеазами; в этом случае вирионы после высвобождения проходят длительную стадию созревания. В зависимости от характера нуклеотидной последовательности в сайте расщепления молекулы пре-НА используется та или иная протеаза.

В зависимости от штамма, вызвавшего заболевание, и состояния организма хозяина патогенность вируса гриппа варьирует в широких пределах. Обычный «сезонный» грипп, вызываемый низкопатогенными штаммами, затрагивает только верхние отделы дыхательных путей. В свою очередь, высокопатогенные штаммы проникают в нижние отделы дыхательных путей, вызывая обширное поражение легких.

Самые патогенные варианты вируса гриппа человека, например, «испанка», способны поражать разные типы клеток, в частности клетки эндотелия. Значительная доля летальных исходов при гриппе обусловлена присоединившейся бактериальной пневмонией (одним из факторов, стимулирующих развитие этой инфекции, служит накопление белка PB1/F2). Однако грипп может вызывать и так называемую «первичную» вирусную пневмонию с отеком легких. Летальность сезонного гриппа варьирует в пределах 0,1–0,2 %; во время пандемии «испанки» летальность составляла 2–5 %. В ответ на гриппозную инфекцию в организме млекопитающих образуются антитела практически ко всем белкам вируса. Однако нейтрализующими свойствами обладают только антитела к НА и, в значительно меньшей степени, к NA. Антитела к NP и другим белкам необходимы для формирования Т-клеточного иммунного ответа, однако они не являются нейтрализующими.

В настоящее время у вирусов гриппа А известно 16 подтипов НА (Н1 – Н16) и 9 подтипов NA (N1 – N9), которые могут давать разные сочетания. Ограниченное число подтипов вирусов гриппа человека, скорее всего, объясняется узким набором хозяйских рецепторов. Циркулирующие в человеческой популяции вирусы постоянно подвергаются давлению со стороны «коллективного» иммунитета, обусловленного присутствием в крови переболевших людей нейтрализующих антител.

Однако вирусы гриппа, как и другие РНК-содержащие вирусы, очень быстро изменяются. Под воздействием «коллективного» иммунитета происходит отбор антигенных вариантов, избегающих воздействия со стороны нейтрализующих антител. Это явление называется «антигенным дрейфом» и на молекулярном уровне выражается в изменении структуры НА в области так называемых антигенных сайтов (места адсорбции нейтрализующих антител на головке НА). Антигенный дрейф требует заменять антигриппозные вакцины едва ли не ежегодно.

Самой страшной пандемией (1918–1919) стал вирус «испанки», завезенный на театр военных действий Первой мировой войны американским экспедиционным корпусом; за полгода в союзных войсках от неизвестной «лихорадки» умерло около 12 тыс. человек. Заболевание быстро распространилось по территории воюющих стран, в том числе Российской империи. Название «испанка», по одной версии, появилось после газетного сообщения о болезни короля Испании. По другой версии, военная цензура засекречивала статистические данные об эпидемии, однако сведения просочились в печать соблюдавшей нейтралитет Испании. Первая волна «испанки» была зафиксирована в марте 1918 г. в США и Европе. Затем вирус стремительно распространился по всему миру и осенью 1918 г. вызвал вторую, более масштабную, волну заболевания. Заболевание характеризовалось особо высокой смертностью. Весной 1919 г. последовала третья, меньшая волна. По общим оценкам, от «испанки» умерло до 40 млн человек. Особенностью пандемии была высокая смертность среди заболевших в возрасте 20–40 лет.

До недавнего времени о свойствах вируса «испанки» ничего не было известно, за исключением подтипа (H1N1). Ситуация в корне изменилась после того, как группа американских вирусологов во главе с Дж. Таубенбергером и Э. Рейд реконструировала его ге-

ном. Для этого использовался законсервированный в 1918 г. материал легочной ткани умерших от «испанки» американских волонтеров Р. Вогана и Дж. Даунса, а также легочной ткани жительницы Аляски (имя неизвестно).

Сем. *Paramyxoviridae* – одно из самых многочисленных и пополняемых новыми представителями. Парамиксовирусные инфекции обычно сопровождаются ярко выраженными клиническими проявлениями и могут приводить к заболеванию с летальным исходом; случаи массовой гибели наземных и морских млекопитающих в дикой природе часто связаны именно с вирусами данного семейства. Сем. *Paramyxoviridae* включает подсем. *Paramyxovirineae* и *Pneumovirineae*. Представители подсем. *Paramyxovirineae*, как правило, вызывают системные поражения, а вирусы подсем.

Pneumovirineae – респираторные инфекции, часто переходящие в хроническую форму. Важнейшими родами *Paramyxovirineae* являются *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* и *Rubulavirus*, которые вызывают заболевания, такие как: болезнь Ньюкасла, вирус кори, вирус чумы копытных, вирус чумы мелких копытных, вирус чумы плотоядных, вирус чумы тюленей, вирусы 1-го и 3-го типов парагриппа человека, вирус парагриппа мышей, вирус эпидемического паротита человека, вирусы 2-го и 4-го типа парагриппа человека.

В подсем. *Paramyxovirineae* входят роды *Pneumovirus* и *Metapneumovirus*, вызывающие заболевания респираторно-синцитиальный вирус человека, пневмовирус мышей, метапневмовирус индеек и метапневмовирус человека. Геномная РНК парамиксовирусов, связанная с белком N, образует спиральный нуклеокапсид, структура которого отчетливо выявляется на негативно контрастированных препаратах. Ряд парамиксовирусов имеет полиморфные капсиды размером от 120 нм до 300–400 нм, окруженные липопротеиновой мембраной.

Характерной чертой вириона парамиксовирусов служат два поверхностных белка:

- 1) рецепторный белок, использующийся для прикрепления к клеткам-мишеням;
- 2) специализированный белок слияния F, с помощью которого осуществляется слияние вирусной и клеточной мембран.

Рецепторные белки парамиксовирусов сильно различаются по строению и функциям. У вируса кори рецепторным белком служит белок H, у вируса парагриппа – белок HN, обладающий нейраминидазной активностью; у респираторно-синцитиального вируса – уникальный белок G. Белки слияния парамиксовирусов более консервативны.

Белок F синтезируется в форме предшественника (F0), который расщепляется хозяйскими протеазами на субъединицы F1 и F2, соединяющиеся затем дисульфидными связями. Мономеры белка F образуют функционально активные тримеры, в центр которых ориентированы гидрофобные домены слияния (~20 а.о.). Помимо двух основных гликопротеинов, оболочка вируса RSV (и некоторых других парамиксовирусов) содержит малый гидрофобный белок SH, который участвует в блокировании апоптоза инфицированных клеток. Мембрана вирионов выстлана матричным белком M. Внутри частицы находится спиральный рибонуклеопротеин (нуклеокапсид), образованный геномной РНК в комплексе с белком N. С нуклеокапсидом связана РНК-зависимая РНК-полимераза, состоящая из большой субъединицы L и вспомогательного белка P.

Геном парамиксовирусов (~15 тыс. н.) состоит из белок-кодирующих генов и некодирующих межгенных последовательностей. Синтез мРНК происходит по так называемому «stop-start» механизму. Нуклеотидная последовательность каждого гена заканчивается стоп-сигналом, в котором имеется полиУ-«тракт», состоящий из нескольких уридиловых остатков. РНК-полимеразы парамиксовирусов, в отличие от РНК-полимераз ортомиксовирусов, способны осуществлять кэпирование и полиаденилирование мРНК. РНК-полимераза останавливается на участке полиУ и полиаденилирует мРНК, присоединяя несколько десятков остатков А. Следующая за стоп-сигналом межгенная после-

довательность 3'-GAA-5' не транскрибируется. Заканчивая транскрипцию гена, полимеразы стартуют заново и при недостатке субстрата могут открепиться от матрицы.

Таким образом, чем дальше от 3'-конца расположен ген, тем меньше вероятность его транскрибирования. Вследствие этого концентрация вирусных мРНК в клетке обратно пропорциональна расстоянию соответствующих генов от 3'-конца геномной РНК. С каждого гена, за исключением гена Р, считывается одна мРНК. В процессе транскрипции гена Р образуется несколько типов мРНК, которые транслируются с образованием белков Р, С и V. Транскрипт, кодирующий белок С, синтезируется путем считывания внутренней ORF со второго старт-кодона, а транскрипт белка V образуется в результате «редактирования» РНК, которое у парамиксовирусов имеет место только у представителей подсем. *Paramyxovirinae*.

Механизм редактирования РНК похож на механизм полиаденилирования и заключается в том, что РНК-полимераза останавливается на U-богатом сайте (у вируса кори он имеет структуру 3'-УАА(У)5ССС-5') и присоединяет гуаниловый остаток к мРНК. Это приводит к сдвигу триплета и, соответственно, к образованию разных белковых продуктов. Белки Р и V имеют одинаковую аминокислотную последовательность от N-конца до сайта редактирования; богатый цистеином С-конец белка V содержит мотив «цинковых пальцев».

Основная функция белка С и белка V состоит в подавлении системы интерферона путем присоединения к транскрипционным факторам STAT1 и / или STAT2. Геном некоторых парамиксовирусов (вируса кори, вируса парагриппа, вируса чумы плотоядных, вируса Хендра, вируса Найпа и др.) подчиняется «правилу шести», т. е. число нуклеотидов кратно шести. Дело в том, что одним из компонентов полимеразного комплекса служит белок N, на субъединицу которого приходится ровно шесть нуклеотидов. При несовпадении количества нуклеотидов с числом, кратным шести, репликация вируса значительно тормозится.

Парамиксовирусы размножаются в цитоплазме. Их онтогенез начинается с адсорбции вирионов на клетках хозяина. Вирусы рода *Morbillivirus* (вирус кори, вирус чумы плотоядных и др.) инфицируют лимфоциты и эпителиальные клетки, используя рецепторы SLAMF и CD46 соответственно.

Связывание с рецептором активирует белок F, который обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран. Вирусный рибонуклеопротеин проникает в цитоплазму, где RdRP осуществляет транскрипцию генома по «стоп-старт» механизму; как отмечалось, полимеразы парамиксовирусов обладают кэпирующей и полиаденилирующей активностью. По мере накопления продуктов трансляции вирусных мРНК происходит переключение с транскрипции на репликацию. Вирусная полимеразы синтезирует полноразмерную реплику геномной РНК, служащую матрицей для синтеза геномной РНК потомства. Рибонуклеопротеины вирусного потомства либо упаковываются в вирионы, либо начинают очередной цикл размножения. Поверхностные гликопротеины процессируются в аппарате Гольджи и экспонируются на клеточной мембране. К цитоплазматическим доменам вирусных рецепторов присоединяется белок М, что стимулирует отпочкование вирионов. Процесс отпочкования и упаковки носит малоупорядоченный характер, что проявляется в образовании множества полиплоидных вирионов (по крайней мере – *in vitro*).

Парамиксовирусы используют несколько стратегий подавления иммунного ответа хозяина. Во-первых, представители рода *Morbillivirus* (вирус кори, вирус чумы плотоядных и т. д.), непосредственно инфицируют клетки иммунной системы, в том числе моноциты, макрофаги и дендритные клетки, используя рецепторы SLAMF. По этой причине инфекция сопровождается продолжительной иммуносупрессией и системным поражением органов, что нередко приводит к гибели хозяина. Во-вторых, на раннем этапе инфекции неструктурные вирусные белки подавляют клеточный сигналинг, в частности, активацию генов интерферона. Эту функцию осуществляют белки V/C (у представите-

лей подсем. *Paramyxovirinae*) и NS1/NS2 (у представителей подсем. *Pneumovirinae*). Подавление сигналинга происходит путем связывания вирусных белков с проводниками сигнала STAT1/STAT2, а также посредством блокирования киназ, активирующих сигнальные пути. Некоторые парамиксовирусы весьма оригинальным способом подавляют иммунный ответ. Так, вирус RSV образует растворимую форму рецепторного белка G, который связывается с антителами и блокирует опосредованное ими узнавание инфицированных клеток цитотоксическими лимфоцитами. Аналогичный механизм подавления адаптивного иммунного ответа использует вирус Эбола (сем. *Filoviridae*). Несмотря на эффективное подавление иммунного ответа на ранней стадии инфекции, парамиксовирусы индуцируют стойкий, часто пожизненный, иммунитет. В отличие от вируса гриппа, постоянно ускользающего от популяционного иммунитета в силу антигенного дрейфа, парамиксовирусы в антигенном отношении более стабильны и однородны.

Вирусы сем. *Rhabdoviridae* распространены очень широко и заражают таких разных животных, как насекомые, рыбы и млекопитающие; кроме того, известны фиторабдовирусы, хозяевами которых служат растения. Вызываемые рабдовирусами заболевания человека и животных, в частности, бешенство и эфемерная лихорадка крупного рогатого скота, характеризуются высокой летальностью. Эффективные методы их лечения отсутствуют; профилактическая вакцинация не препятствует передаче инфекции, а в случае заражения не гарантирует скорое выздоровление. В природных очагах инфекции рабдовирусы передаются от основных хозяев вторичным хозяевам через механические повреждения кожных покровов, векторами-переносчиками, а также половым путем. Поражая центральную нервную систему высших животных, рабдовирусы повышают активность и агрессивность поведения особи, что дополнительно способствует распространению инфекции. Тем не менее, они не обладают промискуитетом; в частности, их передача между животными и растениями, скорее всего, невозможна. В сем. *Rhabdoviridae* входят шесть родов, а также около 85 видов, находящихся вне рода.

Представители родов *Cytorhabdovirus* и *Nucleorhabdovirus* инфицируют растения и передаются насекомыми. К родам *Ephemerovirus*, *Lyssavirus* и *Vesiculovirus* относятся рабдовирусы человека и животных, вызывающие такие заболевания как: лихорадка крупного рогатого скота, бешенство, везикулярный стоматит. Вирионы рабдовирусов имеют форму палочки размером 150–430×80–100 нм. Один конец частицы (пулевидный вариант) или оба конца (бациллоподобный вариант) могут быть закруглены. Оболочка вириона образуется путем отпочкования, и ее липидный состав определяется кругом хозяев. На поверхности, за исключением плоского основания пулевидного вириона, расположены характерные ряды выступов, состоящих из молекул вирусного гликопротеина G. Этот белок играет ключевую роль в адсорбции, он определяет хозяйскую специфичность и тканевую тропизм вируса. Спиральный нуклеокапсид состоит из ssРНК(–) и капсидного белка N. N-концевые домены протомеров ассоциированы с 9-нуклеотидными участками геномной РНК; С-концевые домены стабилизируют эти участки; центральные домены обеспечивают агрегацию протомеров. С нуклеокапсидом связаны два белка репликации – белок L (РНК-зависимая РНК-полимераза) и белок Р (фосфопротеин), входящие в состав полимеразного комплекса.

Нуклеокапсид, в отличие от свободной геномной РНК, обладает инфекционностью, хотя эффективность заражения выше при неповрежденной оболочке. Внутренняя поверхность оболочки выстлана белком матрикса М. Его третичная структура у всех рабдовирусов исключительно консервативна. Этот белок способствует сохранению спиральной укладки капсомеров, связывается с гликопротеином, а также обеспечивает взаимодействие между оболочкой и нуклеокапсидом. Геном всех рабдовирусов, размер которого составляет 1,1–14,9 тыс. н., устроен единообразно.

«Идущая впереди» 3'-концевая последовательность и «идущая позади» 5'-концевая последовательность фланкируют гены пяти белков:

- 1) белка N нуклеопротеина;
 - 2) фосфопротеина P;
 - 3) белка матрикса M;
 - 4) гликопротеина G;
 - 5) мультифункционального белка L, который, в частности, выступает в качестве РНК-полимеразы. Черные кружки – дополнительные рамки считывания.
- Регуляторные участки высококонсервативны и подразделяются на три группы:
- 1) полиU-последовательности на 3'-конце каждого гена, которые у рабдовирусов VSV и RABV имеют структуру AC(U)₇;
 - 2) короткие, длиной 2–6 н., нетранскрибируемые последовательности в межгенной области;
 - 3) консервативный триплет UUG в начале каждой ORF.

Адсорбция осуществляется благодаря сродству между гликопротеином G оболочки вируса и рецептором на поверхности клетки-мишени. В качестве рецептора вирус везикулярного стоматита (VSV) предположительно использует фосфатидилсерин, а нововирусы – фибронектин. Для лиссавирусов рецепторами служат никотин-ацетилхолиновый рецептор, постоянно присутствующий на волокнах мышечной и нервной ткани, а также нейротропин-новый рецептор и нейронадгезионные молекулы.

На примере вируса VSV установлено, что проникновение осуществляется путем клатрин-опосредованного эндоцитоза. Закисление среды в первичной эндосоме стимулирует изменение конформации белка G, в результате чего вирусная мембрана сливается с мембраной эндосомы, нуклеокапсид проникает в цитоплазму. Таким образом, вирусу удается избежать попадания в фаголизосому. В цитоплазме геномная РНК всегда находится в комплексе с белком N. Первичная транскрипция осуществляется белком L, согласно «stop-start» механизму (репликаза прекращает действовать в конце каждой ORF, на время теряет связь с матрицей и возобновляет свое действие в начале следующей ORF – так она проходит всю матрицу от 3'-конца до 5'-конца). Наибольшее число мРНК транскрибируется на 3'-конце, наименьшее – на 5'-конце, что позволяет регулировать количественное соотношение вирусных белков.

Данный механизм регуляции, связанный с консервативной локализацией генов, используется всеми представителями порядка *Mononegavirales*. Связанный с нуклеокапсидом мультифункциональный белок L осуществляет в цитоплазме посттранскрипционную модификацию вирусных мРНК (у него идентифицировано шесть функциональных доменов, однако какой из них отвечает за эспирование, а какой за полиаденилирование, неизвестно). После накопления достаточного количества копий белка N репликаза начинает пропускать стоп-сигналы на концах ORF и переходит к образованию полноразмерных реплик генома (комплекс транскрипции и репликационный комплекс различаются стехиометрическим соотношением белков L и P). Репликативным интермедиатом является РНК(+), которая, как и РНК(–), всегда соединена с капсидным белком. РНК(+) служит матрицей для синтеза геномных РНК, в то время как РНК(–) используется и для транскрипции, и для репликации. На ранних этапах инфекции количество РНК(+) и РНК(–) одинаково, однако позднее начинают преобладать РНК(–). Исследования, проведенные на мутантах вируса VSV, показали, что ключевую роль в этом играют концевые фланкирующие последовательности, которые определяют степень сродства репликационного комплекса к сайту *ori*. Созревание обеспечивается взаимодействием с клеточными мембранами, а также с шаперонами, которые доставляют вирусные белки к месту сборки вириона. Белок G синтезируется на полисомах; посттрансляционное гликозилирование осуществляется в аппарате Гольджи. Белки G и M первоначально встраиваются в цитоплазматическую мембрану; в подмембранной области аккумулируются нуклеокапсиды; зрелые частицы образуются в процессе отпочкования.

С медицинской точки зрения, самым значимым представителем сем. *Rhabdoviridae* является вирус бешенства RABV, патогенез которого изучен лучше всего. Заражение происходит при попадании слюны животного в мышечную ткань человека (это могут быть ссадины, царапины, но чаще всего – укусы). Известны случаи заражения через слизистые оболочки (со слюной или аэрозолями). Вирус может размножаться в мышечной ткани непосредственно в зоне первичного заражения или предварительно транспортируется в центральную нервную систему через чувствительные и двигательные нервные окончания. Имеются данные, что вирус RABV эксплуатирует действующие в аксонах механизмы ретроградного транспорта по микротрубочкам (с участием динеина); связь нуклеокапсида с белками цитоскелета обеспечивает белок P.

Вирус размножается в спинном мозге, в стволовой части головного мозга и в таламусе; затем он распространяется по всей центральной нервной системе. Механизм межнейронного транспорта не ясен, хотя известно, что в нем участвует гликопротеин G. После активного размножения в нейронах вирус центробежно распространяется по органам и выделяется наружу со слюной. Симптомы бешенства проявляются не сразу; инкубационный период составляет от 6 дней до 3 месяцев (к этому моменту вирус диссеминирует в организме). Клиническую картину составляют психомоторное возбуждение, обильное потоотделение, высокая температура, приступы гидро/аэро/фото/акустофобии, паралич конечностей. Поскольку заболевание не сопровождается морфофункциональными изменениями нейронов, механизм патогенеза требует расшифровки. Непосредственной причиной стопроцентной летальности от бешенства, в отсутствие комплексной терапии, является дисфункция дыхательной и сердечно-сосудистой систем.

Наряду с заболеванием бешенством, на территории Бразилии, Индии и Нигерии зарегистрированы единичные случаи легких лихорадок рабдовирусной этиологии – переносчиками инфекций служат москиты, выздоровление наступает через 1–2 дня. Вирус гепатита D (HDV) представляет собой вирус-сателлит вируса гепатита В (HBV). Более 15 млн человек, инфицированных вирусом HBV, одновременно являются носителями вируса HDV. Вирус HDV принадлежит к роду *Deltavirus*; вероятно, его ближайшими родственниками служат вириды. В его геноме, минимальном из всех известных вирусных геномов (1679 н.), закодирован только один белок – дельта-антиген HDAg, представленный двумя изоформами. Нуклеокапсид диаметром 36 нм окружен мембранной оболочкой, в состав которой входят липиды хозяйского происхождения и три формы S-антигена вируса HBV (вируса гепатита В).

Таким образом, вирус HDV не может формировать полноценные частицы, не используя белки другого вируса. Соответственно, он заражает человека только при суперинфекции вирусом HBV. Внутренний нуклеокапсид вируса HDV содержит кольцевую молекулу РНК(-), 74 % нуклеотидов которой комплементарно спарено друг с другом, а также ~200 молекул дельта-антигена HDAg (продукта гена вируса HBV). Вирус HDV, по-видимому, использует те же рецепторы, что и вирус HBV. Нуклеокапсид вируса HDV после попадания в цитоплазму доставляется в ядро – благодаря сигналу ядерной локализации, который имеется у молекулы дельта-антигена HDAg. Вирус HDV не кодирует собственную РНК-полимеразу, и поэтому эксплуатирует РНК-полимеразы клетки-хозяина, каким-то образом заставляя их синтезировать РНК на матрице РНК.

В зараженной клетке образуются три формы РНК – кольцевая геномная минус-нить, кольцевая антигеномная плюс-нить и линейная антигеномная плюс-нить (ее 3'-конец полиаденилирован, она используется в качестве мРНК для трансляции дельта-антигена HDAg). Кольцевая геномная минус-нить синтезируется в ядре с помощью РНК-полимеразы II; кольцевая и линейная антигеномные плюс-нити синтезируются в ядрышке РНК-полимеразой I.

Репликация осуществляется по механизму «катящееся кольцо»; конкатемер разрезается на «мономерные» молекулы геномной РНК, которые замыкаются в кольца благодаря собственной рибозимной активности. Соответствующая 85-нуклеотидная последо-

вательность сходна с рибозимом одного из интронов человека; это позволяет предположить, что вирус HDV происходит от фрагмента человеческого транскрипта.

Некоторые мРНК дельта-вируса подвергаются хозяйскому редактированию под воздействием аденозиндезаминазы, которая превращает аденин в положении 196 в гуанин (в результате stop-кодон UAG становится кодоном UGG). Это приводит к синтезу изоформы дельта-антигена HDAg большей длины. В то время как «короткая» изоформа дельта-антигена HDAg возвращается из цитоплазмы в ядро и участвует в репликации вируса, «длинная» изоформа не может пройти через ядерную пору и служит инициатором сборки нуклеокапсида в цитоплазме. Синтез «короткой» и «длинной» изоформ дельта-антигена HDAg строго сбалансирован. Большое значение в цикле репродукции вируса HDV имеют посттрансляционные модификации дельта-антигена HDAg, которые регулируют и преимущественный синтез той или иной формы РНК вируса, и взаимодействие вируса HDV с S-антигеном вируса HBV при сборке вириона.

По статистике, каждый пятый человек, одновременно зараженный гепатитами В и D, умирает от рака печени; резко возрастает и вероятность быстрого развития цирроза или острой печеночной недостаточности.

1.6.9 Вирусы животных, содержащие ssРНК(+) и имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство *Retroviridae*

ВИЧ-инфекция – инфекционное заболевание человека, вызываемое вирусами иммунодефицита человека и характеризующееся длительным бессимптомным периодом, лимфоденопатией, поражением иммунной и нервной систем, наличием оппортунистических и СПИД-ассоциированных заболеваний, с пандемическим распространением и стопроцентной летальностью.

Как известно, ВИЧ принадлежит к сем. *Retroviridae*, в связи с чем представляет уникальную группу РНК-содержащих вирусов, обладающих ферментом обратной транскриптазой.

Центральной стадией жизненного цикла всех ретровирусов является синтез на матрице вирусной геномной РНК комплементарной ей ДНК (кДНК) с последующим встраиванием кДНК в геном клетки-хозяина. В природе ретровирусы распространены повсеместно. Круг их хозяев весьма широк и включает многие виды беспозвоночных и большинство видов позвоночных животных.

Официальная история возникновения и развития глобальной пандемии ВИЧ-инфекции начинается с 5 июня 1981 г. после сообщения Центра по контролю и профилактике заболеваний США о выявлении в Лос-Анжелесе у пяти гомосексуалистов пневмоцистной пневмонии – тяжелой оппортунистической инфекции, возникающей у лиц с иммунодефицитом. Спустя некоторое время среди гомосексуалистов была зарегистрирована высокая частота саркомы Капоши – редкой сосудистой опухоли кожи, также развивающейся у лиц с клеточным иммунодефицитом. Впоследствии было установлено, что эти заболевания и сопровождающий их иммунодефицит с повышенной частотой возникают среди потребителей внутривенных наркотиков и у лиц с частыми гемотрансфузиями (пациентов с гемофилией). В 1982 г. данное состояние обозначено как СПИД – синдром приобретенного иммунного дефицита.

В мае 1983 г. группа французских ученых под руководством Ф. Барре-Синусси и Л. Монтанье сообщила о выделении от пациента с лимфаденопатией и иммунодефицитом ретровируса LAV (*Lymphadenopathy-Associated Virus*) – наиболее вероятного возбудителя СПИД. Обнаруженный вирус был передан в США в лабораторию Р. Галло для дополнительного изучения. В конце 1983 г. научная группа Ф. Вонг-Стаал, руководимая Р. Галло, объявила о выделении собственного варианта ретровируса – возбудителя СПИД. В дальнейших исследованиях было установлено, что геномы обоих вариантов вирусов идентичны.

В 1986 г. возбудитель СПИД получил свое окончательное наименование – «вирус иммунодефицита человека или ВИЧ». В этом же году в Западной Африке Ф. Клавель с соавторами выделили новый вид вируса иммунодефицита человека – ВИЧ-2. В 2008 г. за открытие ВИЧ Франсуазе Барре-Синусси и Люку Монтанье присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Теории происхождения ВИЧ

1. ВИЧ искусственно создан в конце 70-х гг. XX в. посредством методов генной инженерии.
2. Антропогенное происхождение:
 - а) ВИЧ – типичный ретровирус, существовавший у людей с древних времен и эволюционировавший вместе с человеком;
 - б) ВИЧ циркулировал в глухих уголках Центральной Африки, затем через о. Гаити попал в США и быстро распространился на все континенты.
3. Зоонозное происхождение:
 - а) генетические рекомбинации вируса лейкоза человека и животных (ретровируса типа С) с вирусом опухоли молочной железы мышей (ретровирус типа В) или с вирусом обезьяньего СПИД (ретровирус типа Д);
 - б) мутанты ВИЧ зелёной марышки трансформировались и обрели нового хозяина – человека.

Вирус иммунодефицита человека относится к роду *Lentivirus*. Установлено два вида вирусов – ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Внутри вида данные вирусы образуют различные генетические группы. Это связано с нестабильностью генома ВИЧ. ВИЧ-1 подразделяется на группы М, О, N, Р. Более 90 % всех случаев инфекции вызывается вирусами группы М (от англ. *main* – главная, основная). Генетические группы делятся на многочисленные подтипы. В группе М установлено свыше 10 вирусных подтипов (А–К). Подтипы способны рекомбинировать друг с другом с образованием циркулирующих рекомбинантных форм ВИЧ. ВИЧ-2 разделяется на девять генетических групп (А–I). Вследствие активных мутаций в ходе ВИЧ-инфекции из первичного вируса постоянно образуются его новые генетические варианты.

Геномы ВИЧ-1 и ВИЧ-2 обладают лишь частичной гомологией между собой (около 40–60 %). Однако для каждого из них установлен близкородственный вирус иммунодефицита обезьян (для ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита шимпанзе, для ВИЧ-2 – вирус обезьян-мангабеев). Поэтому считается, что ВИЧ-1 и ВИЧ-2 эволюционировали из соответствующих видов вирусов иммунодефицита обезьян. ВИЧ-1 имеет пандемическое распространение и является основным возбудителем ВИЧ-инфекции, поэтому далее мы будем разбирать свойства этого вируса, называемого просто ВИЧ. ВИЧ-2 эндемичен для Западной и Центральной Африки, в других странах был выявлен в единичных случаях. Инфекция, вызываемая этим ВИЧ, имеет более длительное и доброкачественное течение.

Вирион ВИЧ имеет сферическую форму диаметром 100–280 нм. Он окружен внешней липидной двухслойной оболочкой-суперкапсидом (сложный вирус). На поверхности вирионов имеются гликопротеиновые шипы, выполняющие рецепторную функцию. Каждый из них представлен гликопротеином gp160, который нарезается клеточной протеазой с образованием двух белков – gp41 и gp120. Белок gp41 погружен в липидную оболочку; находящийся снаружи белок gp120 является внешней частью рецептора. Под липидной оболочкой расположен сферический слой матриксного белка р17. Внутри его находится сердцевина вируса (капсид), образованная белком р24 и белком р6. Нуклеокапсид имеет форму усеченного конуса. Он содержит вирусный геном и ферменты репликации ВИЧ. Капсидные и суперкапсидные структурные белки ВИЧ являются вирусными антигенами. Геном ВИЧ (как и всех ретровирусов) представлен двумя копиями однонитевой несегментированной положительной (+)РНК.

Молекулы РНК образуют димер, соединенный водородными связями на одном из концов. С молекулами РНК тесно связан нуклеокапсидный белок р6. Вирусный геном содержит девять генов, из них три кодируют структурные белки, шесть – регуляторные. Структурный ген *gag* (англ. *group specific antigen*) кодирует внутренние белки капсида вируса. Структурный ген *env* (англ. *envelope* – оболочка) отвечает за синтез наружных гликопротеинов gp41 и gp120. Ген *pol* (*polymerase*) кодирует ферменты ВИЧ – обратную транскриптазу (p66), протеазу (p32) и интегразу (p11).

У ВИЧ также имеются регуляторные гены, кодирующие синтез одноименных регуляторных белков:

- ген *tat* (белок Tat активирует обратную транскрипцию вирусной РНК);
- ген *rev* (белок Rev регулирует экспрессию вирусных структурных белков);
- ген *nef* (белок Nef подавляет экспрессию CD-молекул и молекул HLA на мембранах зараженных клеток);
- ген *vif* (белок Vif угнетает синтез противовирусных клеточных белков);
- ген *vpr* (белок Vpr стимулирует репликацию вирусной РНК и транскрипцию вирусных белков);
- ген *vpr* у ВИЧ-1 (белок Vpr усиливает высвобождение вирусных частиц из клетки);
- ген *vpx* у ВИЧ-2 (белок Vpx обеспечивает эффективную обратную транскрипцию генома ВИЧ-2).

Для ВИЧ характерна высокая частота спонтанных мутаций (1–10 на геном вируса при его однократной репликации). Это обусловлено скоростью процесса репликации и многочисленными ошибками в работе обратной транскриптазы. В результате образуется набор новых вариантов вируса («генетическое облако», квазивиды). При этом преимущество получают варианты, устойчивые к факторам иммунитета и противовирусным химиотерапевтическим средствам. На стадии адсорбции и проникновения ВИЧ в клетки происходит специфическое взаимодействие вирусных суперкапсидных гликопротеинов gp120 и gp41 с мембранными клеточными рецепторами. На первом этапе gp120 связываются с молекулами CD4 на мембранах клеток системы иммунитета.

Популяции клеток с высокой плотностью CD4-рецепторов, связывающие ВИЧ:

- «наивные» и активированные (CD4+) Т-хелперы;
- Т-лимфоциты памяти.

Кроме того, в количестве, достаточном для фиксации вируса, CD4-рецепторы представлены на мембранах дендритных клеток, моноцитах и макрофагах, клетках макрофагальных линий ЦНС (астроциты и глиальные макрофаги), нейронах, эпителии кишечника, шейки матки и ряде других. Данные типы клеток являются основными мишенями ВИЧ.

В отдельных случаях ВИЧ может связываться с другими видами рецепторов (интегрины, лектины). Взаимодействие «gp120-CD4» – необходимое, но недостаточное условие для проникновения вириона ВИЧ в клетку. Для этого требуется наличие специфических корецепторов к вирусу на мембранах. Основными корецепторами к ВИЧ являются молекулы клеточных хемокиновых рецепторов CXCR4 и CCR5. Молекула CXCR4 экспрессирована на мембранах Т-лимфоцитов; молекула CCR5 – на мембранах макрофагов/моноцитов, дендритных клеток, Т-лимфоцитов. Связывание gp120 с молекулой CD4 приводит к конформационной перестройке gp120 и последующему связыванию gp120 с молекулой корецептора на мембране. На втором этапе взаимодействия происходит проникновение gp41 в мембрану клетки-мишени, что обеспечивает слияние суперкапсида вируса с клеточной мембраной. Кроме того, вирионы ВИЧ могут проникать в клетки посредством эндоцитоза.

Нуклеокапсид вируса, содержащий РНК и вирусные ферменты, поступает в цитоплазму. Здесь происходит депротенинизация ВИЧ с выходом геномной РНК и ферментов. Далее выполняется обратная транскрипция – синтез комплементарной ДНК (кДНК)

на матрице вирусной геномной РНК ферментом обратной транскриптазой. Вирусная РНК при этом разрушается обратной транскриптазой. Вновь образованная двухцепочечная кДНК транспортируется в ядро. Под действием фермента интегразы происходит встраивание кольцевой формы вирусной ДНК в ДНК клеточных хромосом (интеграция генома, образование провируса). В интегрированном состоянии ВИЧ остается в геноме хозяина пожизненно. Репликация вируса стимулируется клеточными факторами транскрипции (например, под влиянием фактора транскрипции провоспалительных цитокинов NF-κB). Их функция повышается при активации Т-лимфоцитов. Поэтому наиболее интенсивное размножение ВИЧ происходит в активированных Т-лимфоцитах.

Под действием клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы в ядре выполняется транскрипция вирусных мРНК. Часть из них подвергается сплайсингу, перемещается в цитоплазму и транслируется на рибосомах с образованием вирусных регуляторных белков (Tat, Rev). Эти белки возвращаются в ядро, где стимулируют дальнейшую репликацию вируса, синтез геномных РНК, вирусных мРНК и их последующий транспорт в цитоплазму. На рибосомах происходит трансляция вирусных белков с образованием промежуточных полипротеинов. Фермент протеаза гидролизует их, формируя структурные вирусные белки. Этот процесс продолжается во время сборки и созревания вирионов.

Окончательная сборка ВИЧ происходит в области цитоплазматической мембраны. Вирусы покидают клетку через мембрану путем почкования, приобретая внешнюю липидную оболочку-суперкапсид. Заражение соседних клеток происходит как после их взаимодействия с отделившимися свободными вирионами ВИЧ, так и вследствие прямого перемещения вирусов из клетки в клетку в местах высокой клеточной концентрации (например, в лимфоузлах). Каждый цикл репликации ВИЧ сопровождается множественными мутациями и рекомбинациями вирусных геномов.

Посредством связывания с рецептором CD4 и корецепторами CXCR4 или CCR5 вирус проникает в чувствительные клетки. Он поражает (CD4+) Т-лимфоциты (Т-хелперы, Т-клетки памяти), клетки макрофагальных линий (моноциты, тканевые макрофаги), сперматозоиды. В течение 24 часов после контакта с вирусом инфицируются дендритные клетки в месте его проникновения; спустя 24–48 часов происходит миграция этих клеток в лимфатические узлы; после 5–6 дней вирус обнаруживается в крови (виремия); на 4-й неделе у пациента развиваются первые признаки заболевания.

В ходе обратной транскрипции кДНК ВИЧ встраивается в клеточный геном (образование провируса). Система иммунитета не в состоянии удалить все зараженные клетки, и ВИЧ-инфекция персистирует в организме пожизненно. Размножение вирусов ведет к прогрессирующему уменьшению популяции (CD4+) Т-хелперных клеток, цитокинов и естественных киллеров, инфицированных ВИЧ. Больной, зараженный ВИЧ, становится беззащитным перед возбудителями различных инфекции. Одним из наиболее ранних признаков заболевания является поражение органов иммунной системы, в частности, лимфатических узлов. Они увеличиваются в размерах, меняется их строение.

Внедрение высокоэффективных методов лечения коренным образом изменило характер течения и распространения ВИЧ-инфекции и значительно улучшило ее индивидуальный прогноз. Без адекватной терапии средняя продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных приблизительно соответствует 10 годам. При точном соблюдении рекомендаций по лечению продолжительность жизни пациентов с ВИЧ приближается к средней по популяции и может достигать 70–80 лет и более. Современная схема лечения ВИЧ получила название «высокоактивная антиретровирусная терапия – ВААРТ». Схема включает несколько групп противовирусных химиопрепаратов, имеющих различные механизмы действия. Эти препараты блокируют отдельные этапы репродукции ВИЧ и останавливают прогрессирование инфекции. Согласно текущим рекомендациям ВОЗ, антиретровирусную терапию должны получать все ВИЧ-инфицированные, независимо от состояния системы иммунитета. Широкое использование ВААРТ позволяет резко снизить распространение ВИЧ-

инфекции, в том числе прервать гетеросексуальный и вертикальный (от матери к ребенку) пути передачи вируса. Это создает объективные предпосылки для прекращения эпидемии ВИЧ-инфекции. Лечение СПИД-ассоциированных инфекций заключается в назначении адекватной антимикробной химиотерапии соответствующих заболеваний.

Профилактика ВИЧ-инфекции по-прежнему остается неспецифической. Она включает проведение медицинских профилактических мероприятий, а также массовую и эффективную санитарно-просветительную работу. Необходимо своевременное выявление ВИЧ-инфицированных среди групп риска (лица, контактные по ВИЧ, наркоманы, лица, предлагающие сексуальные услуги, и т. д.). Выполняется профилактика инфицирования медицинского инструментария, тестирование препаратов крови. Разработана и применяется система мероприятий по предупреждению заражения медработников при контакте с биологическими жидкостями ВИЧ-инфицированных лиц. Проводится активная пропаганда знаний среди населения по предупреждению заражения ВИЧ половым путем (исключение случайных связей, использование презервативов при сексуальных контактах и т. д.), а также при внутривенном употреблении наркотиков.

Пост-экспозиционная профилактика выполняется после контакта с биологическими жидкостями ВИЧ-инфицированных лиц (незащищенный сексуальный контакт, укол инфицированной иглой, порез скальпелем при проведении оперативных вмешательств, переливание зараженных препаратов крови и т. д.). Пост-экспозиционная профилактика должна начинаться в максимально сжатые сроки (от одного-двух дней до одной недели с момента контакта). Используется современная схема ВААРТ, включающая ингибиторы интегразы ВИЧ. После начальной профилактики рекомендовано продолжение лечения, по крайней мере, в течение четырех недель. В дальнейшем проводится неоднократное тестирование пострадавших на антитела к ВИЧ в срок до шести месяцев после контакта. Несмотря на многократные попытки, вакцина против ВИЧ до сих пор не создана. Это определяется крайней изменчивостью вируса. Первой вакциной, доведенной до стадии клинических испытаний, стала вакцина, разработанная группой Р. Галло к 2015 г. Ее основой является модифицированная форма вирусного рецептора gp120.

1.6.10 Вирусы животных, содержащие dsДНК и имеющие стадию обратной транскрипции. Семейство *Hepadnaviridae*

Вирусы сем. *Hepadnaviridae* проявляют ярко выраженный тропизм в отношении гепатоцитов. Сем. *Hepadnaviridae* содержит два рода – *Avihepadnavirus* и *Orthohepadnavirus*.

Все гепаднавирусы обладают высокой специфичностью по отношению к хозяину. Вирусы рода *Avihepadnavirus* вызывают гепатит В у аистов, гусей, уток и цапель. Вирусы рода *Orthohepadnavirus* вызывают гепатит В у грызунов – земляных белок, луговых собак, сурков и сусликов, а также у приматов – шерстистых обезьян Нового Света, человекообразных обезьян (гиббонов, горилл, орангутанов и шимпанзе) и человека. Эти вирусы передаются через кровь, лимфу и тканевую жидкость, а также при половом контакте и трансплацентарно.

Вирус гепатита В человека (HBV) – один из самых мелких вирусов животных; его диаметр равен 42 нм. Икосаэдрический капсид ($T = 4$) заключен в мембранную оболочку. Часто встречаются неполноценные вирионы, лишенные нуклеокапсида и состоящие только из оболочки, содержащей гликопротеиновый поверхностный антиген HBsAg, который в избытке синтезируется в зараженной вирусом клетке. Вероятно, роль таких частиц заключается в том, чтобы принять на себя основной удар противовирусного иммунного ответа. Геном вируса гепатита В человека представлен кольцевой молекулой ДНК размером 3,2 тыс. п. н.

Характерная особенность вирусов *Hepadnaviridae* состоит в том, что их геномная ДНК – частично двунитевая молекула (плюс-нить ДНК является неполной, а в минус-нити имеется разрыв). Кроме того, к 5'-концу минус-нити ДНК ковалентно присоедине-

на молекула вирусной полимеразы. Такое строение геномной ДНК связано со способом ее репликации. В 1982 г., спустя 12 лет после открытия обратной транскрипции, американские вирусологи Дж. Саммерс и У. Мэйсон, изучавшие механизм репродукции вируса гепатита В уток (ДНВВ), показали, что репликация ДНК-генома может осуществляться не напрямую, а через РНК интермедиат. Иными словами, они впервые установили, что ретровирусы могут быть не только РНК-содержащими, но и ДНК-содержащими. Рассмотрим этот вариант обратной транскрипции на примере вируса НВВ.

Геномная ДНК вириона, имеющая одну недостроенную нить, при инфекции доставляется в ядро, где происходит репаративный синтез ДНК, и молекула приобретает форму завершеного кольца. Вирус НВВ не имеет гена интегразы, и поэтому его ДНК не встраивается, как правило, в хромосомную ДНК клетки-хозяина; кольцевая молекула геномной вирусной ДНК сохраняется в ядре в качестве эписомы, с которой транскрибируются вирусные РНК, в том числе прегеномная РНК размером 3,5 тыс. н.

Транскрипция прегеномной РНК начинается с сайта геномной ДНК находящегося в upstream-положении от 12-нуклеотидного прямого повтора dr I и прекращается на сигнальной последовательности полиаденилирования, расположенной в downstream-положении от него. В результате этого прегеномная РНК имеет на обоих концах прямые повторы длиной ~200 н. и оказывается длиннее своей матрицы (поскольку участок ДНК между сайтом инициации транскрипции и сайтом полиаденилирования скопирован дважды).

Кэпированная с 5'-конца и полиаденилированная по 3'-концу молекула прегеномной РНК поступает в цитоплазму, где она служит матрицей для синтеза двух белков – капсидного белка С, молекулы которого сразу же начинают образовывать субвирусную частицу на основе «своей» молекулы прегеномной РНК, и входящего в состав вириона белка Р (вирусной полимеразы). Белок Р является уникальной автопраймирующей обратной транскриптазой – один из аминокислотных остатков Туг (точнее, его гидроксильная группа) в N-концевом домене связывает первый нуклеотид при синтезе минус-нити ДНК.

Обратная транскрипция инициируется благодаря тому, что белок Р связывается с консенсусной последовательностью вблизи 5'-конца молекулы прегеномной РНК, принимает необходимую конформацию и осуществляет полимеризацию 3–4 нуклеотидов. Образовавшаяся цепочка «перебрасывается» на консенсусную последовательность на 3'-конце прегеномной РНК (напомним, что концы этой молекулы идентичны), т. е. происходит первая смена матрицы. В ходе реакции полимеризации белок Р сохраняет ковалентную связь с 5'-концом минус-нити ДНК. Достраивание минус-нити ДНК продолжается по всей длине РНК-матрицы вплоть до 5'-конца; по ходу этого процесса матрица расщепляется благодаря РНК-активности белка Р. Когда синтез минус-нити ДНК завершается, остается нерасщепленным кэпированный 15–18-нуклеотидный конец молекулы прегеномной РНК, содержащий реплику повтора dr I (которая становится праймером для синтеза плюс-нити ДНК). Если праймер остается на исходном месте (5–10 % случаев), то конечным продуктом становится dsДНК, концы которой замыкаются в кольцо. Однако в большинстве случаев праймер по неизвестной причине транслоцируется на гомологичную последовательность, расположенную вблизи 5'-конца минус-нити ДНК. Синтез плюс-нити ДНК продолжается до конца матрицы (по аналогии с синтезом «strong-stop» ДНК(+) у представителей сем. *Retroviridae*). Затем, так же как у ретровирусов, благодаря гомологии между 5'-концевой и 3'-концевой последовательностями минус-нити ДНК происходит вторая смена матрицы, и синтез плюс-нити возобновляется. При этом синтезируемая молекула ДНК замыкается в кольцо.

Синтез плюс-нити ДНК продолжается до конца матрицы (у вирусов гепатита В птиц) или прекращается на середине минус-нити (у вирусов млекопитающих), оставляя кольцо геномной ДНК релаксированным. Причина преждевременной остановки синтеза плюс-нити неясна. Возможно, что в ходе этого процесса постепенно изменяется конформация

молекулы ДНК в практически собранном капсиде, что, в свою очередь, влияет на его внешнюю форму и служит сигналом для приобретения мембранной оболочки. Когда формирование частицы заканчивается, нуклеотиды перестают проникать внутрь нее, и синтез ДНК прекращается.

Геном гепаднавирусов, несмотря на его малый размер, несет информацию о семи белках. Их рамки считывания взаимно перекрываются, и в результате альтернативного сплайсинга синтезируется несколько мРНК.

Белок С представляет собой структурный белок капсида, другое его название – НВсАg. С этого же гена считывается белок Е (Е-антиген), роль которого неясна.

Белок S, или НВsАg, является основой мембранного гликопротеина. Его ген может транскрибироваться с трех разных сайтов, поэтому на поверхности вириона экспонированы «короткая», «средняя» и «длинная» формы этого антигена. Наконец, белок Х выполняет регуляторную функцию при экспрессии вирусных генов и модулирует несколько сигнальных путей гепатоцита.

Вирусы сем. *Hepadnaviridae* репродуцируются только в гепатоцитах – их практически невозможно поддерживать в клеточной культуре. Для заражения клетки достаточно одного вириона. Инфекционный цикл начинается с взаимодействия между S-антигеном вируса и неустановленным клеточным рецептором, на роль которого претендуют гепарансульфат (входит в состав углеводной части мембранных гликопротеинов гепатоцита) и карбоксипептидаза (трансмембранный белок; синтезируется, в частности, в клетках печени, имеет высокое сродство к S-антигену вируса гепатита В уток). Затем, по-видимому, путем эндоцитоза вирус проникает в цитоплазму и транспортируется по микротрубочкам цитоскелета к внешней мембране ядерной оболочки. Там капсид разрушается, ДНК вируса проникает в нуклеоплазму через комплекс ядерной поры. В ядре достраивается плюс-нить геномной ДНК, и кольцевая dsДНК служит матрицей для транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II типа хозяина. Образующиеся транскрипты – короткие мРНК и прегеномная РНК – экспортируются в цитоплазму. Там на прикрепленных рибосомах короткие мРНК транслируются в белки оболочки, РНК транслируется в белок С, а также с меньшей эффективностью в белок Р. Белок Р сразу же присоединяется к 5'-концу собственной матричной молекулы (прегеномной РНК). Одновременно с формированием капсида вокруг прегеномной РНК в вирионах начинается процесс обратной транскрипции. На ранних этапах инфекции синтезированная ДНК в комплексе с белками вновь направляется в ядро (где соответственно увеличивается число замкнутых кольцевых вирусных матриц), и цикл повторяется.

В ядре инфицированной клетки образуется 10–30 эписом вирусного происхождения. По мере того как накапливается достаточное количество молекул мембранных антигенов вирусной оболочки, начинается отпочкование ДНК-содержащих капсидов в полость цистерн эндоплазматического ретикулума, на мембранах которого скапливаются белки оболочки вириона. Получившие оболочку вирионы направляются по секреторному пути и выходят из гепатоцита посредством экзоцитоза. После этого они готовы инфицировать соседние клетки. Часть из них попадает в кровь, где у больных гепатитом В выявляются вирусные антигены и антитела к ним.

У гепатита В короткая острая стадия, которая, как правило, протекает незаметно. В 30–50 % случаев инфекция переходит в хроническую форму, в остальных случаях иммунная система успешно справляется с вирусом, и заболевшие либо полностью излечиваются, либо становятся латентными носителями вируса, хотя прямая угроза их здоровью отсутствует (если только не ослаблен иммунитет).

Хронический гепатит В может протекать бессимптомно или проявляться в форме слабого хронического воспаления печени, однако в любом случае в течение нескольких лет развивается цирроз.

При гепатите В многократно увеличивается вероятность развития карциномы печени, поскольку геномная ДНК вируса может в результате незаконной рекомбинации случайно интегрироваться в произвольные сайты хромосом клетки-хозяина, что нарушает баланс экспрессии протоонкогенов. Другой опасностью, повышающей вероятность развития патологий печени, служит постоянная и, по сути дела, аутоиммунная реакция организма на присутствие клеток, зараженных вирусом.

По оценкам ВОЗ, во всем мире до 350 млн человек больны гепатитом В или являются носителями вызывающего его вируса HBV. Подавляющая часть заражений (8–20 % населения Земли) приходится на Китай, страны Юго-Восточной Азии и Африки, в то время как в Западной Европе, Северной Америке и Австралии носителями HBV являются около 2 % жителей.

2 ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Лабораторная работа № 1 «Методы изучения вирусов»

Цель: познакомиться с методами, применяемыми в вирусологии для идентификации и изучения вирусных инфекций.

Реактивы и материалы: рабочие тетради, карандаш, линейка, ручка.

Краткие теоретические сведения

На сегодняшний день описано более 2000 различных вирусов, для верификации которых используют различные методов диагностики.

1. Вирусоскопические методы диагностики. Вирусоскопический метод заключается в выявлении вируса в исследуемом материале под микроскопом. Чаще всего используют электронный микроскоп, реже – люминесцентный. Световая микроскопия применяется только для выявления крупных вирусов, с использованием методов сверхкраски. Кроме того, световую микроскопию используют для обнаружения внутриклеточных включений, образующихся в клетках при вирусных инфекциях. С помощью вирусоскопического метода можно диагностировать следующие заболевания: вирус простого герпеса, вирус краснухи, острый небактериальный гастроэнтерит и др.

Достоинства: дешевый и высокоэффективный метод.

Недостатки: вирусоскопический метод позволяет выявлять только некоторые заболевания.

2. Вирусологические методы диагностики. Вирусологический метод заключается в заражении исследуемым материалом чувствительной биологической модели (лабораторные животные, куриные эмбрионы или культуры клеток), индикации вируса и его дальнейшая идентификация. Достоинством этого метода является 100 % достоверность. При заражении лабораторных животных идентификацию вирусов проводят по клинической картине болезни, патологоанатомическим изменениям; окончательная диагностика осуществляется индикацией вирусов в материале от животных, например, с помощью реакции гемагглютинации. Эта же реакция позволяет выявлять вирусы в курином эмбрионе. В культуре клеток наличие вирусов определяют по цитопатическому действию (в частности, по образованию внутриклеточных включений), гемадсорбции, феномену бляшкообразования, реакцией гемагглютинации, цветной пробой). Идентификацию вируса осуществляют с помощью серологических реакций (РПГА, РТГА, РН, РСК и др.).

Достоинства: вирусологические методы позволяют точно определить природу возбудителя.

Недостатки: вирусологические методы требуют много времени (5–7 дней), значительных материальных затрат; возбудитель опасен.

3. Серологические методы диагностики. Серологические исследования – это методы изучения определенных антител или антигенов в сыворотке крови больных, основанные на реакциях иммунитета. Обнаружение в сыворотке крови больного антител к возбудителю инфекции или соответствующего антигена позволяет установить причину заболевания. Серологические исследования включают в себя различные серологические реакции: реакция агглютинации; реакция преципитации; реакция нейтрализации; реакция с участием комплемента; реакция с использованием меченых антител или антигенов. Реакции агглютинации – это простые реакции склеивания корпускулярных антигенов с помощью антител:

- прямые реакции агглютинации, которые используют для выявления антител в сыворотке крови больного. Добавление взвеси убитых вирусов к сыворотке больного вызывает образование хлопьевидного осадка;

- реакция пассивной, или непрямой гемагглютинации основана на использовании эритроцитов с адсорбированными на их поверхности антигенами, взаимодействие которых с соответствующими антителами сыворотки крови больных приводит к образованию фестончатого осадка;
- реакция торможения гемагглютинации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать вирусы, которые в результате теряют свойство склеивать эритроциты.

Реакции преципитации – реакции, в которых происходит осаждение комплекса «антиген – антитело». Антиген в данном случае должен быть растворимым. Осадок комплекса «антиген – антитело» называется преципитатом. Реакцию ставят путем наслоения раствора антигена на иммунную сыворотку. При оптимальном соотношении «антиген – антитело» на границе этих растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации антигена.

Наибольшее распространение получила реакция преципитации в полужидком геле агара (двойная иммуно-иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и др.). Реакцию используют для определения содержания в крови иммуноглобулинов различных классов, компонентов системы комплемента. Реакция нейтрализации основана на способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие вирусов на чувствительные клетки или ткани. При отсутствии повреждающего эффекта смеси антител и вирус на культуру клеток говорят о специфичности взаимодействия комплекса «антиген – антитело». Реакции с участием комплемента основаны на активации комплемента в результате присоединения его к комплексу «антиген – антитело». Если комплекс «антиген – антитело» не образуется, то комплемент присоединяется к комплексу «эритроцит-антиэритроцитарное антитело», вызывая тем самым гемолиз (разрушение) эритроцитов (реакция радиального гемолиза). Реакция основана на том, что антигены тканей или вирусы, обработанные иммунными сыворотками, мечеными флюорохромами, способны светиться в ультрафиолетовых лучах люминисцентного микроскопа (реакция иммунофлюоресценции). В иммуноферментном анализе вместо флюорохромов иммунную сыворотку можно метить ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). Реакцию оценивают по окрашиванию раствора в желто-коричневый (пероксидаза) или желто-зеленый (фосфотаза) цвет.

4. Радиоиммунологический метод – количественное определение антител или антигенов, меченых радионуклидами, с применением аналогичных антигенов или антител. С помощью серологических методов можно диагностировать следующие заболевания: грипп, клещевой энцефалит, гепатит В, корь, краснуха, натуральная оспа, герпес, полиомиелит и др.

Достоинства: высокая чувствительность, простота техники постановки и быстрота ответа, не требуют особой чистоты компонентов и возможность документирования результатов.

Недостатки: недостоверность данных, необходимость в математических расчетах.

5. Молекулярно-биологические методы диагностики. Молекулярно-биологические методы широко используются для диагностики инфекционных заболеваний. Наиболее широко применяется метод ПЦР (полимеразная цепная реакция). ПЦР позволяет диагностировать: гепатиты, ВИЧ, ротавирусные инфекционные заболевания, ветряную оспу, герпес, вирус папилломы человека и еще несколько десятков болезней.

Достоинства: быстрая и корректная диагностика.

Недостатки: дорогостоящие методы.

Порядок выполнения работы

1. Ознакомиться с методами, применяемыми в вирусологии для идентификации и изучения вирусных инфекций.
2. Заполнить **Таблицу 3** в тетрадах.

Таблица 3 – Методы, применяемые в вирусологии для идентификации и изучения вирусных инфекций

Название метода	Сущность метода	Достоинства	Недостатки	Применение
Вирусоскопический метод				
Вирусологические методы				
Серологические методы:				
1. Реакция агглютинации				
2. Реакция преципитации				
3. Реакция нейтрализации				
Реакции с участием комплемента				
Реакция иммунофлюоресценции				
Иммуноферментный анализ				
Молекулярно-биологические методы диагностики вирусных инфекций (ПЦР)				

Контрольные вопросы:

1. Какие методы используются для идентификации вирусов?
2. В чем сущность вирусоскопического метода?
3. В чем сущность вирусологического метода?
4. В чем сущность серологического метода?
5. Расскажите про метод реакции с участием комплемента.
6. Расскажите про метод реакции иммунофлюоресценции.
7. Расскажите про иммуноферментный анализ.
8. Расскажите про метод ПЦР.

Лабораторная работа № 2 «Заражение вирусами куриных эмбрионов»

Цель: вспомнить строение куриных эмбрионов и рассмотреть методы их экспериментального заражения.

Реактивы и материалы: куриные эмбрионы, вирусосодержащий материал, инсулиновые шприцы, препаровальные иглы, покровное стекло, пинцет, спиртовки, овоскоп, термостат, карандаш, спирт, лейкопластырь, расплавленный парафин, йод, вата, перчатки.

Краткие теоретические сведения

Куриные эмбрионы могут быть использованы для заражения вирусами в период с 5-го по 12-й день инкубации.

Снаружи яйцо с развивающимся куриным эмбрионом покрыто твердой пористой скорлупой, к которой плотно прилегает подскорлупная оболочка. С тупого конца яйцо разделено на два листка, между которыми располагается воздушная камера. Тело зародыша лежит в яйце эксцентрично, спиной ближе к скорлупе, голова направлена в сторону воздушной камеры (**Рис. 15**).

Зародыш погружен в околоплодную жидкость, заполняющую амниотическую полость, и пуповиной связан с желтком. Под подскорлупной оболочкой находится аллантоисная полость, покрывающая амнион и желточный мешок, а к 10–11-му дню замыкающаяся в остром конце яйца.

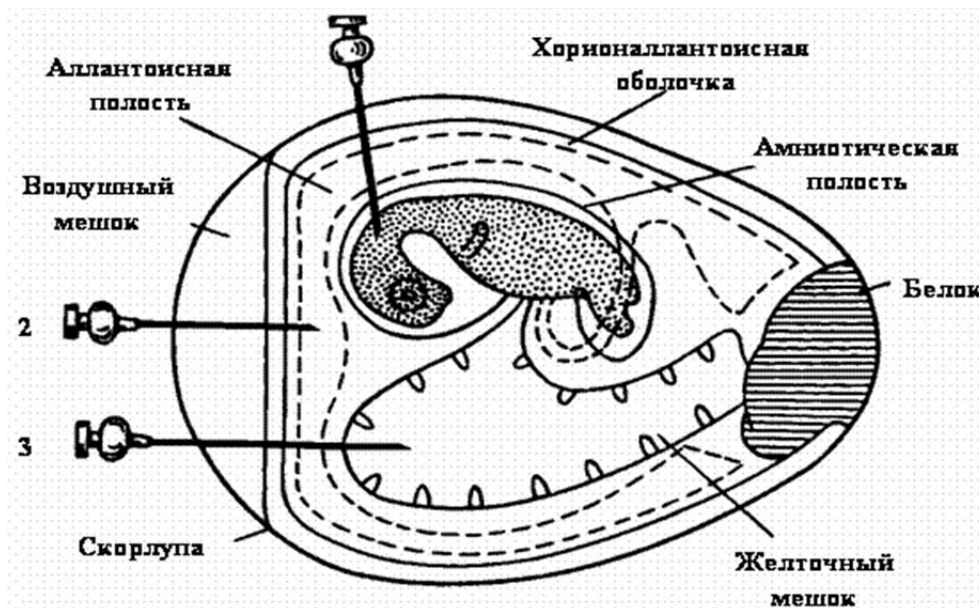


Рис. 15 – Схематическое изображение 10-дневного эмбриона
[Строганова И. Я., 2013 г.]

В процессе развития аллантоисная оболочка срастается с хорионом, образуя единую хорионаллантоисную оболочку (ХАО). В остром конце яйца находится остаток белка. Куриные эмбрионы транспортируют очень аккуратно, в инкубатории, постоянно поддержания температуру 37 °С. Хранятся они в термостате при такой же температуре и влажности 60–70 % (в термостате устанавливаются открытые широкогорлые сосуды с водой, вентиляционные отверстия термостата должны быть открыты).

Необходимо до момента заражения дать возможность эмбрионам в течение суток адаптироваться к новым условиям и нормализовать свои функции после транспортного стресса. Снесенные курицей оплодотворенные яйца сразу в лаборатории пригодны для заражения в течение 10 дней. Размножение вируса возможно: в ХАО, желточном мешке, аллантоисной жидкости, амниотической жидкости и эмбрионе.

Подготовка куриных эмбрионов к заражению включает:

- 1) подготовку рабочего места – подготовка ламинарного места, инструменты кипятят, обрабатываем спиртом и обжигаем на горелке;
- 2) овоскопирование скорлупы – просмотр яиц против достаточно яркого источника света (овоскоп), в результате чего на неосвещенной стороне скорлупы образуются тени от внутренних структур. На скорлупе графитным карандашом отмечают границу воздушной камеры, место расположения зародыша и участок бессосудистой зоны размером 0,5×0,5 см, куда и вводят вирусосодержащий материал. Кроме того, при овоскопии определяют, жив или погиб зародыш (зародышей, проявляющих активные движения при хорошей кровенаполненности сосудов ХАО, считают живыми);
- 3) дезинфекцию скорлупы – скорлупу обрабатывают йодированным спиртом, затем уже в боксе повторно протирают, а иногда еще и фламбируют (обрабатывают пламенем смоченного спиртом тампона).

Выделяют следующие методы заражения:

➤ **Заражение в аллантоисную полость.** При заражении этим методом хорошо размножаются вирусы гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей, везикулярного стоматита и др.

Первый вариант заражения: эмбрион фиксируют вертикально тупым концом вверх. В скорлупе на стороне зародыша, а иногда с противоположной зародышу стороны выше границы воздушной камеры делают отверстие диаметром 1 мм. Иглу вводят параллельно продольной оси на глубину 10–12 мм. Отверстие закрывают стерильным парафином (**Рис. 16а**).

Второй вариант заражения: Делаем в скорлупе над воздушной камерой отверстие. Это отверстие необходимо для выхода части воздуха. Эмбрион заражают со стороны бессосудистой зоны хорионаллантоисной оболочки (ХАО). Отверстие закрывают парафином (**Рис. 16б**).

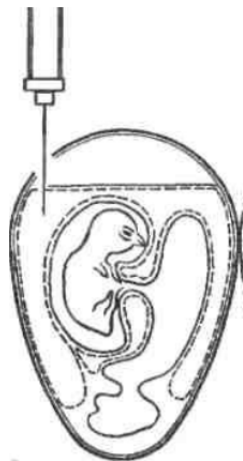


Рис. 16а – Заражение в аллантоисную полость
[Строганова И. Я., 2013 г.]

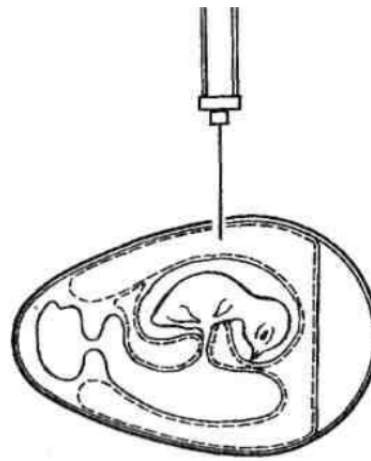


Рис. 16б – Заражение в аллантоисную полость
[Строганова И. Я., 2013 г.]

➤ **Заражение на хорионаллантоисную оболочку.** Этот метод заражения куриных эмбрионов чаще используют для культивирования эпителиотропных и пантропных вирусов оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы плотоядных, болезни Ауески, катаральной лихорадки овец и др. Такое заражение может быть выполнено через естественную или искусственную воздушную камеру. Для заражения *через естественную воздушную камеру* эмбрион располагают вертикально тупым концом вверх и в скорлупе против центра воздушной камеры вырезают круглое окно диаметром 15–20 мм. Через это окно пинцетом снимают подскорлупную оболочку, а на участок ХАО наносят 0,2 мм вирусосодержащей суспензии (**Рис. 17а**), отверстие закрывают лейкопластырем или покровным стеклом, укрепив его расплавленным парафином. Для заражения *через искусственную воздушную камеру* эмбрион помещают в штатив горизонтально зародышем вверх.



Рис. 17а – Заражение куриного эмбриона на ХАО
через естественную воздушную камеру
[Строганова И. Я., 2013 г.]

В скорлупе делают два отверстия: одно небольшое над центром воздушной камеры (предназначено для отсасывания из нее воздуха), а другое, диаметром 0,2–0,5 см, сбоку, со стороны зародыша (изначально необходимо снять кусочек скорлупы, сдвинуть подскорлупную оболочку так, чтобы мог пройти воздух). Далее резиновой грушей через отверстие отсасывают воздух из естественной воздушной камеры, а через боковое отверстие наружный воздух устремляется внутрь, образуя искусственную воздушную камеру, дном которой является ХАО. Боковое отверстие закрывают кусочком лейкопластыря. Дальнейшую инкубацию эмбрионов, зараженных этим методом, проводят в горизонтальном положении боковым отверстием вверх (Рис. 17б).

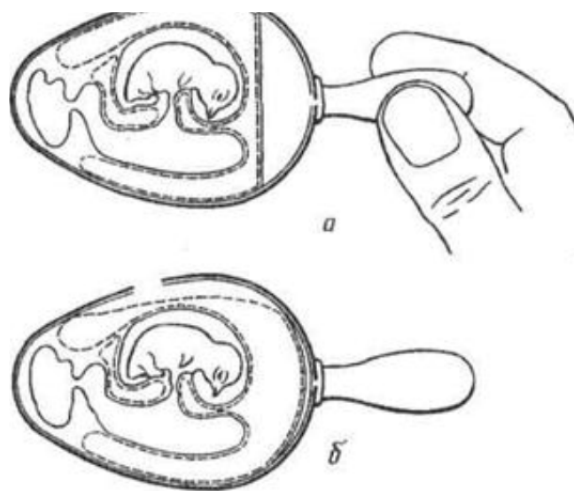


Рис. 17б – Заражение куриного эмбриона на ХАО через искусственную воздушную камеру [Строганова И. Я., 2013 г.]

➤ **Заражение в желточный мешок.** Большой частью им пользуются для размножения хламидий, а также вирусов болезни Марека, ринопневмонии лошадей, катаральной лихорадки овец и др. Используют два варианта заражения:

1. Эмбрионы помещают в штатив в вертикальном положении. В скорлупе делают отверстие над центром воздушной камеры и вводят иглу на глубину 3,5–4 см под углом 45 градусов к вертикальной оси в направлении, противоположном месту нахождения зародыша (Рис. 18).
2. Эмбрион помещают в горизонтальное положение. При этом зародыш находится внизу, а желток над ним. Отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина.



Рис. 18 – Заражение в желточный мешок [Строганова И. Я., 2013 г.]

➤ **Заражение в амниотическую полость.**

Метод используется при культивировании вирусов гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей и др. Существуют два способа заражения.

Закрытый способ. Яйцо помещают на овоскопе в горизонтальном положении зародышем. Через отверстие в скорлупе над воздушной камерой вводят иглу с затупленным концом по направлению к зародышу.

Открытый способ. Скорлупу над воздушной камерой срезают так, чтобы образовалось окно диаметром 1,5–2,5 см, снимают подскорлупную оболочку. Пинцетом продавливают хорионлантоисную оболочку по направлению к зародышу. Когда пинцет достигнет его, зародыша захватывают, амниотическую оболочку вместе с ХАО подтягивают к окну и вводят вирусосодержащий материал (Рис. 19).



Рис. 19 – Заражение в амниотическую полость [Строганова И.Я., 2013 г.]

Отверстие закрывают лейкопластырем, а эмбрион инкубируют в вертикальном положении.

➤ **Заражение в тело зародыша.** *Первый вариант.* Заражают так же, как в амнион закрытым способом (смотреть выше). *Второй вариант.* Заражают так же, как в амнион открытым способом (смотреть выше): через окно в скорлупе подтягивают пинцетом тело зародыша.

➤ **Заражение в кровеносные сосуды ХАО.** Удаляют участок скорлупы, наносят 1–2 капли спирта, что делает на некоторое время подскорлупную оболочку прозрачной. Под контролем глаза на овоскопе иглу вводят в сосуд, что подтверждается его подвижностью при небольших боковых движениях иглы. Обнаженный участок подскорлупной оболочки закрывают кусочком лейкопластыря. Также можно срезать скорлупу над воздушной камерой, подскорлупную оболочку смачивают спиртом, в ставшие видными сосуды ХАО вводят материал. Отверстие закрывают кусочком стерильного лейкопластыря. Перед дальнейшей инкубацией на скорлупе зараженных любым методом куриных эмбрионов простым (графитным) карандашом пишут, чем заражен эмбрион и когда, а если нужно, то и другие сведения.

Зараженные куриные эмбрионы помещают в термостат для дальнейшей инкубации, в процессе которой происходят репродукция внесенных вирусов и их накопление в соответствующих структурах. Температура инкубации эмбрионов 33–38 °С, в зависимости от свойств вируса.

За эмбрионами ведут постоянное наблюдение. Гибель эмбрионов в первые 24 часа после заражения чаще всего обусловлена размножением грибов, бактериальной микрофлоры, внесенных в эмбрион вместе с инокулятом, или травмированием при заражении. Эта гибель считается неспецифической. В более поздние сроки эмбрионы, как правило, гибнут в результате размножения в них вируса. Обнаружив погибшие эмбрионы, их сразу же переносят в холодильник с температурой 4 °С, что способствует сохранению активности накопившегося в эмбрионе вируса, с другой – уплотнению тканей и запуску сосудов, что значительно облегчает последующее вскрытие.

Для каждого вируса и даже штамма этот срок является определенным и варьирует в пределах от 2 до 7–8 сут. Так, для вируса ньюкаслской болезни штамма Н он составляет 2–3 дня, для того же вируса штамма В – 1–5 дней, для вируса инфекционного ларинготрахеита птиц – 5 дней и т. д. Затем все эмбрионы умерщвляют охлаждением при 4 °С и вскрывают в течение не менее 3–4 часов.

Необходимо отметить, что наиболее часто используют заражение в аллантоисную полость и на хорионаллантоисную оболочку, реже – в амниотическую полость и в желточный мешочек, совсем редко – в тело зародыша и в кровеносные сосуды ХАО.

Выбор метода определяется тропизмом вируса, а также целью заражения.

Порядок выполнения работы

1. Ознакомиться с методами экспериментального заражения куриных эмбрионов, зарисовать в рабочие тетради **Рис. 17а**.
2. Осуществите заражение на хорионаллантоисную оболочку через естественную воздушную камеру. Эмбрион расположите вертикально тупым концом вверх и в скорлупе против центра воздушной камеры сделайте круглое окно диаметром 15–20 мм. Через это окно пинцетом снимите подскорлупную оболочку, а на участок ХАО нанесите 0,2 мм вирусосодержащий суспензии (**Рис. 17а**), отверстие закройте лейкопластырем или покровным стеклом, укрепив его расплавленным парафином.
3. Понаблюдайте за теми изменениями, которые произошли с куриными эмбрионами после заражения. Зафиксируйте.

Контрольные вопросы:

1. Опишите метод заражения в аллантоисную полость.
2. Опишите метод заражения на хорионаллантоисную оболочку.
3. Опишите метод заражения в желточный мешок.

4. Опишите метод заражения в амниотическую полость.
5. Опишите метод заражения в тело зародыша.
6. Опишите метод заражения в кровеносные сосуды ХАО.

Лабораторная работа № 3 «ДНК и РНК вирусы, патогенные для человека и животных»

Цель работы: ознакомиться с семействами ДНК и РНК-содержащих вирусов, патогенных для человека и животных.

Реактивы и материалы: рабочие тетради, карандаш, линейка, ручка.

Краткие теоретические сведения

Согласно классификации Д. Балтимора, можно выделить семь основных групп вирусов животных и человека:

- 1) одноцепочечные РНК-вирусы положительной полярности – вирусы сем. *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae* и *Togaviridae*;
- 2) одноцепочечные РНК-вирусы отрицательной полярности – вирусы сем. *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*;
- 3) двуцепочечные РНК-вирусы – вирусы сем. *Birnaviridae* и *Reoviridae*;
- 4) одноцепочечные ДНК-вирусы – вирусы сем. *Circoviridae* и *Parvoviridae*;
- 5) двуцепочечные ДНК-вирусы – вирусы сем. *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae* и *Papillomaviridae*;
- 6) одноцепочечные РНК-ретровирусы – вирусы сем. *Retroviridae*;
- 7) двуцепочечные ДНК-ретровирусы – вирусы сем. *Hepadnaviridae*.

Порядок выполнения работы

8. Ознакомиться с заболеваниями, вызванными ДНК и РНК-содержащими вирусами.
9. Заполнить **Таблицу 4** в рабочих тетрадях.

Таблица 4 – Характеристика ДНК и РНК-содержащих вирусов

Семейство	Форма и размер вириона, нм	Наличие или отсутствие оболочки	Тип симметрии капсомера	Н. к.	Заболевание	Пути передачи	Лечение
Herpesviridae							
Adenoviridae							
Papillomaviridae							
Poxviridae							
Hepadnaviridae							
Parvoviridae							
Asfarviridae							
Circoviridae							
Iridoviridae							
Orthomexeviridae							
Paramyxoviridae							
Coronaviridae							
Picomaviridae							
Reoviridae							
Retroviridae							
Rhabdoviridae							
Caliciviridae							
Filoviridae							
Bunyaviridae							
Togaviridae							
Flaviviridae							
Birnaviridae							

Контрольные вопросы:

1. Какие семейства принадлежат к ДНК-содержащим вирусам?
2. Опишите жизненный цикл ДНК-содержащих вирусов.
3. Какие заболевания вызывают ДНК-содержащих вирусов?
4. Меры профилактики и лечение заболеваний, вызванных ДНК-содержащих вирусов.
5. Какие семейства принадлежат к РНК-содержащим вирусам?
6. Опишите жизненный цикл (+) РНК-содержащих вирусов.
7. Опишите жизненный цикл (–) РНК-содержащих вирусов.
8. Какие заболевания вызывают РНК-содержащих вирусов?
9. Меры профилактики и лечение заболеваний, вызванных РНК-содержащих вирусов.

Лабораторная работа № 4 «Антивирусная терапия»

Цель работы: ознакомиться с неспецифическими и специфическими мерами профилактики вирусных инфекций.

Реактивы и материалы: рабочие тетради, карандаш, линейка, ручка.

Краткие теоретические сведения

Профилактика вирусных заболеваний подразделяется на неспецифическую (санитарно-гигиенические и зоогеографические мероприятия) и специфическую (использование вакцин, сывороток и иммуноглобулинов).

Вакцина представляет собой биологический препарат, приготовленный из возбудителей инфекции, лишенных патогенных свойств, но сохранивших иммуногенные свойства. Введение в организм вакцины ведет к активации факторов иммунитета, в том числе и к образованию антител против того возбудителя, из которого приготовлена вакцина.

Вакцина – это биопрепарат, предназначенный для создания активного иммунитета.

Порядок выполнения работы

1. Ознакомиться с неспецифическими и специфическими мерами профилактики вирусных инфекций
2. Заполнить **Таблицу 5** в тетрадях.

Таблица 5 – Вакцины, применяемые для предупреждения вирусных инфекций

Вакцины	Технология получения	Преимущества	Недостатки	Заболевания
Живые				
Инактивированные				
Субъединичные				
Синтетические				
Антиидиотипические				
Генно-инженерные				

Контрольные вопросы:

1. Что относят к неспецифическим и специфическим мерам профилактики вирусных заболеваний?
2. Дайте определение понятию «вакцина».
3. В зависимости от биологической системы, используемой для культивирования, штамма вируса, какие вакцины бывают?
4. В зависимости от видовой принадлежности штамма, какие вакцины бывают?
5. В зависимости от количества типов или видов возбудителей, включенных в состав вакцин, какие вакцины выделяют?
6. В зависимости от жизнеспособности вируса, какие вакцины бывают?

Лабораторная работа № 5 «Титр бактериофага, способы его определения. Получение фаговых лизатов»

Цель: рассмотреть методы титрования бактериофагов и получения фаговых лизатов.

Реактивы и материалы: агар, хлороформом, буферный раствор (бульон), питательные среды, суспензия бактериофага, чашки Петри, стеклянный шпатель, центрифуга, бактериальная петля, мембранные фильтры.

Краткие теоретические сведения

Титр бактериофага – это количество активных фаговых частиц в единице объема исследуемого материала. Для определения титра бактериофага наиболее широко в работе с бактериофагами применяется метод агаровых слоев, который был предложен А. Грациа в 1936 г. Этот метод отличается простотой выполнения и точностью получаемых результатов и с успехом используется также для выделения бактериофагов.

Фаголизат – это суспензия бактериофага, полученная после лизиса зараженных фагом клеток бактерий. Для получения фаголизата можно использовать как жидкие, так и агаризованные питательные среды. Спектр литического действия фага – это способность бактериофага заражать и вызывать лизис определенного круга бактерий. По наличию бактериофагов, например, в воде, можно косвенно судить о присутствии в ней тех или иных бактерий, которые являются для них хозяевами. Определение спектра литического действия используют при эпидемиологическом анализе вспышек инфекционных заболеваний. Исследование спектра литического действия фага может быть полезно при определении пути попадания данного фага на производство, а также при выборе способов придания клеткам признака фагоустойчивости. Спектр литического действия фага можно охарактеризовать по индексу чувствительности культур – доли бактериальных культур, лизирующихся данным фагом, по отношению к общему числу испытанных штаммов. Например, если из 10 испытанных культур фагом лизируется 4, то можно говорить, что индекс чувствительности культур к данному фагу равен 0,25. Этим показателем можно пользоваться при сравнении спектров литического действия нескольких фагов.

Порядок выполнения работы

1. Титр бактериофага:

- ✓ Суспензию бактериофага смешивают с культурой чувствительных бактерий, вносят в агар низкой концентрации («мягкий агар») и наслаивают на поверхность ранее подготовленного 1,5%-ного питательного агара в чашке Петри. Инкубируют в течение 6–18 часов, бактерии размножаются внутри верхнего «мягкого» слоя агара в виде множества колоний, получая питание из нижнего слоя 1,5%-ного питательного агара, который применяется в качестве подложки. Низкая концентрация агара в верхнем слое создает пониженную вязкость, что способствует хорошей диффузии фаговых частиц и инфицированию ими бактериальных клеток. Инфицированные бактерии подвергаются лизису, в результате чего появляется потомство фага, которое вновь заражает находящиеся в непосредственной близости с ними бактерии. Образование негативной колонии для фагов Т-группы вызвано только одной частицей бактериофага, и, следовательно, число негативных колоний служит количественным показателем содержания бляшкообразующих единиц в исследуемом образце.
- ✓ Может быть использован также однослойный метод. Сущность заключается в том, что на поверхность чашки с питательным агаром вносят суспензии бактерий и бактериофага, после чего смесь распределяют стеклянным шпателем.

2. Определение титра бактериофага:

- ✓ Последовательно разводят исходную фаговую суспензию в буферном растворе либо в бульоне (шаг разведения 10^{-1}). Для каждого разведения используют

отдельную пипетку, а смесь интенсивно перемешивают. Из каждого разведения суспензии делают «высев» фага на газон чувствительных бактерий *E. coli* В. Для этого 1 мл разведенного фага вносят в пробирку с 3 мл расплавленного и охлажденного до 48–50 °С «мягкого агара», после чего в каждую пробирку добавляют 0,1 мл культуры чувствительного микроорганизма (*E. coli* В), находящегося в логарифмической фазе роста. Содержимое перемешивают, вращая пробирку между ладонями и избегая образования пузырей. Затем быстро выливают на поверхность агаризованной (1,5%-ной) питательной среды в чашке Петри и равномерно распределяют по ней, осторожно покачивая чашку. При титровании методом агаровых слоев следует засеять параллельно не менее двух чашек одного и того же разведения фага. После застывания верхнего слоя чашки переворачивают крышками вниз и помещают в термостат с температурой 37 °С, оптимальной для развития чувствительных бактерий. Учет результатов производят через 18–20 часов инкубирования. Количество негативных колоний подсчитывают аналогично подсчету колоний бактерий, а титр фага определяют по формуле (1):

$$N = \frac{nD}{V} \quad (1)$$

где N – количество фаговых частиц в 1 мл материала;
 n – среднее количество негативных колоний на чашку;
 D – номер разведения;
 V – объем высеваемой пробы, мл.

Результаты эксперимента заносят в **Таблицу 6**.

Таблица 6 – Определение титра бактериофага и морфология формирующихся негативных колоний

Используемый бактериофаг	Морфология негативной колонии (форма, диаметр, мм)	Титр бактериофага, частиц / мл	Титр жизнеспособных клеток бактерий, кл. / мл	Множественность инфекции

3. Получение фаголизата. Фаголизат получают путем размножения фага на клетках чувствительной культуры. В бульонную культуру бактерий *E.coli* В вносят 1–2 мл фаговой суспензии либо касаются бактериальной петлей изолированной негативной колонии и эмульгируют ее в питательном бульоне. После соответствующего периода инкубирования и просветления суспензии фаголизат освобождают от бактериальных клеток одним из следующих способов: фильтрованием через мембранный фильтр, центрифугированием для осаждения клеток (6 тыс. об./мин, 10 мин), обработкой фаголизата хлороформом в соотношении 10:1 с последующим энергичным встряхиванием в течение 1 мин, инкубированием в течение 1 часа при комнатной температуре и центрифугированием.

Техника получения фаголизата бактериофагов T-группы в жидкой питательной среде. 18–24-часовую культуру чувствительных к фагу бактерий (*E. coli* В) засевают в жидкую питательную среду в соотношении 1:10 и культивируют с аэрированием при оптимальных условиях (37 °С) до логарифмической фазы роста в течение 2,5–3 часов (до плотности 2–10⁸ клеток/мл). После этого в бактериальную культуру добавляют суспензию фага с таким расчетом, чтобы множественность инфекции составляла единицу, и продолжают инкубирование в течение 6–8 часов с аэрацией до просветления бактериальной культуры. Фаголизат освобождают от бактерий низкоскоростным центрифугиро-

ванием (6 тыс. об./мин, 10 мин) или фильтрованием через бактериальные фильтры и определяют титр полученного фага. В жидкой среде можно получать большие объемы фаголизатов с содержанием фаговых частиц около 5–10⁹ в 1 мл.

Техника получения фаголизата бактериофагов Т-группы с использованием агаризованной питательной среды. Этот метод, предложенный М. Сванстромом и М. Адамсом в 1951 г., заключается в лизисе фагом густой суспензии чувствительных бактерий в слое полужидкого агара. В 3 мл 0,7%-ной агаризованной питательной среды вносят 0,1 мл культуры чувствительных бактерий *E. coli* В в логарифмической фазе роста и 1 мл суспензии одного из фагов Т-группы (конечная концентрация 10⁴–10⁵ частиц/мл), перемешивают и выливают на поверхность 1,5%-ной агаризованной питательной среды в чашках Петри. Таким образом проводят засев нескольких чашек. Чашки инкубируют в течение 18–20 часов, а затем в каждую из них вносят 5 мл физиологического раствора или жидкой питательной среды и шпателем осторожно снимают верхний (0,7%-ный) слой агара. Для удаления бактерий и остатков агара полученную массу центрифугируют (6 тыс. об./мин, 10 мин). После серии разведений полученного фаголизата определяют титр фага. Экспериментально выявлено, что на плотной питательной среде количество полученного фаголизата оказывается меньше, чем в случае приготовления его в жидкой питательной среде, но титр бактериофага выше.

Определение спектра литического действия фага. На поверхность 1,5%-ной агаризованной среды в чашке Петри пипеткой наносят каплю исследуемого фага, втирают с помощью шпателя. На поверхность агаризованной среды наносят каплями исследуемые бактериальные культуры в стационарной фазе роста. Чашки помещают в термостат на 28 °С. Результаты учитывают через 24 часа. О способности тестируемого фага вызывать лизис исследуемых бактерий судят по отсутствию роста чувствительных к исследуемому фагу бактерий. Результаты эксперимента заносят в **Таблицу 7**.

Таблица 7 – Определение спектра литического действия исследуемого бактериофага

Используемый бактериофаг	Анализируемые бактерии	Чувствительность бактерий к используемому фагу	Индекс чувствительности бактерий к данному фагу

Контрольные вопросы:

1. Дать определения понятиям «титр бактериофага», «фаголизат», «спектр литического действия фага».
2. Как определяют титр бактериофага?
3. Какие вы знаете способы получения фаголизата?
4. Какие вы знаете способы для определения спектра литического действия фага?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ И РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пиневиц, А. В. Вирусология : учебник / А. В. Пиневиц [и др.]. – СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2012. – 432 с.
2. Зинченко, А. И. Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии / А. И. Зинченко, Д. А. Паруль. – Минск : «Вышэйшая школа», 2005. – 208 с.
3. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология : учебное пособие / О. К. Поздеев ; под ред. В. И. Покровского – 4-е изд., испр. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 768 с.
4. Альтштейн, А. Д. Общая и частная вирусология / А. Д. Альтштейн [и др.] ; под ред. В. М. Жданова, С. Я. Гайдамовича. – М. : Медицина, 1982. – 1104 с.
5. Лурия, С. Общая вирусология / С. Лурия [и др.]. – М. : Мир, 1981. – 680 с.
6. Медицинская вирусология : руководство / под ред. Д. К. Львова. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 1400 с.
7. Пильщикова, Н. В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии [Текст] : учебное пособие / Н. В. Пильщикова. – Ростов н/д : Феникс, 2007. – 378 с.
8. Канашкова, Т. А. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология : практикум / Т. А. Канашкова [и др.] – 3-е изд., испр. – Минск : БГМУ, 2017. – 138 с.
9. Жмакин, А. И. Медицинская бактериология и вирусология [Текст] : практикум для студентов лечебного и педиатрического факультетов / А. И. Жмакин, М. В. Горецкая ; Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга. – 3-е изд. – Гродно : ГрГМУ, 2014. – 364 с.
10. Основы микробиологии, вирусологии, иммунологии [Текст] : учебник : допущено Министерством образования Российской Федерации для студентов медицинских училищ / ред.: А. А. Воробьев, Ю. С. Кривошеин. – М. : Мастерство, 2001. – 223 с.
11. Жавненко, В. М. Практикум по вирусологии / В. М. Жавненко, В. И. Науменков, В. Н. Алешкевич. – Минск : Дизайн ПРО, 1998. – 143 с.
12. Соляник, Т. В. Микробиология : курс лекций : в 5 ч. / Т. В. Соляник, М. А. Гласкович, А. А. Гласкович. – Горки : БГСХА, 2014. – Ч. 5 : Основы вирусологии. – 46 с.
13. Строганова, И. Я. Куриные эмбрионы и их использование в вирусологии : метод. указания к лабораторным занятиям / И. Я. Строганова ; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2013. – 19 с.
14. Вирусология : методические рекомендации к лабораторным занятиям / Авт.-сост.: А.Н. Евтушенков [и др.]. – Минск : БГУ, 2006. – 50 с.
15. Cann, A. J. Principles of Molecular Virology / A. J. Cann. – Academic Press is an imprint of Elsevier : London, 2014. – 305 p.
16. Matthews R.E.F. Plant Virology / R.E.F. Matthews. – Academic Press : London, 1991. – 695 p.
17. Hull, R. Plant Virology / R. Hull. – Academic Press : US, 2013. – 1118 p.
18. Richman, D. D. The essential reference of clinical virology / D. D. Richman, R. J. Whitley, F. G. Hayden. – John Wiley & Sons : USA, 2020. – 1489 p.
19. Flint, S. Jane Principles of Virology, Volume 2: Pathogenesis and Control / S. Jane Flint. – John Wiley & Sons : USA, 2020. – 528 p.
20. Buck, K. W. Fungal Virology / K. W. Buck. – CRC Press-Taylor & Francis Group : USA, 2018. – 311 p.

Учебное издание

Составители:

Воробьёва Мария Михайловна
Красочко Ирина Александровна
Воронова Нина Владимировна
Гуминская Елена Юрьевна
Сеньковец Тамара Александровна

**Неклеточные инфекционные агенты
микроорганизмов, человека и животных**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск *Ю. В. Чечун*

Редактор *Т.И.Сакович*
Корректор *Ю.В. Цвикевич*

Подписано в печать 29.04.2022 г. Формат 60×84/8.
Бумага офсетная. Гарнитура «Гаймс». Ризография.
Усл. печ. л. 11,62. Уч.-изд. л. 8,31.
Тираж 87 экз. Заказ № 347.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе
Полесского государственного университета.
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23.