ВИРУСОЛОГИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ВИРУСОЛОГИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Учебно-методическое пособие
для студентов биологического факультета

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

УДК 579(075.8)

Авторы-составители: *Е. В. Глинская, Е. С. Тучина, С. В. Петров*

Вирусология. Методические материалы: Учеб.-метод. пособие для студ. биол. фак. / Авторы-сост. Е. В. Глинская, Е. С. Тучина, С. В. Петров. – Саратов, 2013. 84 с.: ил.

ISBN 978-5-292-03935-8

Учебно-методическое пособие составлено в соответствии с «Программой по вирусологии для студентов биологических факультетов университетов».

Оно содержит теоретический материал, касающийся истории развития вирусологии, природы и происхождения вирусов, химического состава, морфологии и репродукции вирусов, разнообразия вирусов, патогенеза и лабораторной диагностики вирусных инфекций, особенностей противовирусного иммунитета. В конце пособия приведены план проведения лабораторных работ, словарь основных терминов и тестовые задания для самоконтроля.

Для студентов биологического факультета, обучающихся по направлению подготовки 020400 «Биология».

Рекомендуют к печати:

Кафедра микробиологии и физиологии растений
биологического факультета
(Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского)

Доктор биологических наук Л. В. Карпунина
(Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова)

ISBN 978-5-292-03935-8

© Е. В. Глинская, Е. С. Тучина,
С. В. Петров, составление, 2013
© Саратовский государственный
университет, 2013

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ВВЕДЕНИЕ

Современная вирусология – фундаментальная самостоятельная научная дисциплина. Объектом изучения вирусологии являются вирусы – ультрамикроскопические организмы, обладающие только одним типом нуклеиновой кислоты, лишенные собственных систем синтеза белка и мобилизации энергии и являющиеся абсолютными внутриклеточными паразитами.

Вирусология занимается исследованием природы и происхождения вирусов, их химического состава, морфологии, механизмов размножения, биохимических и молекулярно-генетических аспектов их взаимоотношений с клеточными организмами, проблемами противовирусного иммунитета и разработкой мер и средств предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний.

Актуальность вирусологии на настоящий момент не вызывает сомнений. Вирусы являются одними из главных возбудителей многих инфекционных и онкологических заболеваний человека, животных и растений. Вирусы представляют собой идеальный объект для молекулярных биологов и генетиков.

Пособие предназначено для подготовки студентов к семинарским и практическим занятиям по курсу «Вирусология». В пособии рассмотрены теоретические вопросы общей вирусологии, представлен детальный план проведения практических работ, приведен перечень необходимой литературы, а также тестовые задания для самоконтроля.

Хочется надеяться, что учебное пособие «Вирусология. Методические материалы» окажется полезным как студентам и преподавателям вузов, так и специалистам-вирусологам.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Раздел 1. Вирусология как наука. История развития вирусологии. Природа и происхождение вирусов.

ВИРУСОЛОГИЯ КАК НАУКА

Вирусология – наука, изучающая природу и происхождение вирусов, особенности их химического состава, генетики, строения, морфологии, механизмов размножения и взаимодействия с клеточными организмами.

Вирусология занимает важное место среди биологических наук. Велико ее теоретическое и практическое значение для медицины, ветеринарии и сельского хозяйства. Вирусные болезни широко распространены у человека, животных и растений; кроме того, вирусы служат моделями, на которых изучаются основные проблемы генетики и молекулярной биологии. Изучение вирусов привело к пониманию тонкой структуры генов, расшифровки генетического кода, выявлению механизмов мутации.

Современная вирусология включает следующие разделы:

- общая вирусология, изучающая основные принципы строения и размножения вирусов, их взаимодействие с клеткой-хозяином, происхождение и распространение вирусов в природе.
- частная (медицинская, ветеринарная и сельскохозяйственная) вирусология изучает особенности различных систематических групп вирусов человека, животных и растений и разрабатывает методы диагностики, профилактики и лечения вызываемых этими вирусами болезней.
- молекулярная вирусология исследует молекулярно-генетическую структуру вирусов, строение и функции вирусных нуклеиновых кислот, механизмы экспрессии вирусных генов, процессы взаимодействия с клеткой, природу устойчивости организмов к вирусным заболеваниям, молекулярную эволюцию вирусов.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ВИРУСОЛОГИИ

Первые упоминания о вирусных болезнях людей и животных встречаются в дошедших до нас письменных источниках древних народов. В них, в частности, содержатся сведения об эпизоотиях бешенства у волков, шакалов и собак и полиомиелите в Древнем Египте (II–III тыс. лет до н. э.). О натуральной оспе было известно в Китае за тысячу лет до нашей эры. Давнюю историю имеет также желтая лихорадка, на протяжении столетий косившая первопроходцев в тропической Африке и моряков. Первые описания вирусных болезней растений относятся к живописной пестролепестности тюльпанов, которые уже около 500 лет выращивают голландские цветоводы.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Началом становления вирусологии как науки можно считать конец XIX века. Работая над созданием вакцины против бешенства, Л. Пастер в 80-х гг. XIX века впервые применил термин «вирус» (от лат. «virus» – яд) для обозначения инфекционного агента. Пастер был первым, кто начал использовать лабораторных животных в работах по изучению вирусов. Он инокулировал материал, полученный от больных бешенством, в мозг кролика. Однако Пастер не делал различия между вирусами как таковыми и другими инфекционными агентами.

Первым, кто выделил вирусы как самостоятельную группу инфекционных агентов, был русский учёный Д. И. Ивановский. В 1892 г. в результате собственных исследований он пришёл к выводу, что мозаичную болезнь табака вызывают бактерии, проходящие через фильтр Шамберлана, которые, кроме того, не способны расти на искусственных субстратах. Представленные данные о возбудителе табачной мозаики длительное время являлись критериями для отнесения возбудителей болезней к «вирусам»: фильтруемость через «бактериальные» фильтры, неспособность расти на искусственных средах, воспроизведение картины заболевания фильтратом, освобожденным от бактерий и грибов.

В 1898 г. М. Бейеринк подтвердил и расширил исследования Д. И. Ивановского о вирусе табачной мозаики и сформулировал первую полноценную теорию о вирусах как о новом классе микроорганизмов и возбудителей болезней. Несмотря на то что многие зарубежные ученые приписывали ему открытие вирусов, М. Бейеринк признал приоритет Д. И. Ивановского.

В последующие годы микробиологи и врачи установили вирусную этиологию многих антропонозных и зоонозных болезней. Так, уже в 1898 г. Ф. Леффлер и П. Фрош установили фильтруемость возбудителя ящура коров. Они первыми показали, что вирусы могут поражать не только растения, но и животных.

Серия открытий новых вирусов пришлась на первое десятилетие XX века. Началась она с исследований У. Рида, установившего в 1901 г. вирусную природу тропической желтой лихорадки. У. Рид руководил исследованиями, в ходе которых было установлено, что вирус жёлтой лихорадки присутствует в крови больного в течение первых трёх дней заболевания и что он может передаваться при укусе комара; таким образом, впервые было показано, что вирусы могут передаваться насекомыми. Семь лет спустя, было доказано, что вирусными болезнями являются также полиомиелит (К. Ландштейнер и Э. Поппер), лихорадка денге (П. Ашбери и Ч. Крейч) и лейкоз кур (В. Эллерман и О. Банг). В 1911 г. Ф. Раус привел неопровержимые доказательства наличия в вытяжке тканей саркомы кур онкогенного вируса, способного вызывать опухоль у здоровых птиц. Благодаря исследованиям Х. Арагана и Э. Пашена (1911–1917 гг.) была при-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

знана вирусная природа ветряной оспы. Одновременно с ними Т. Андерсон и Дж. Гольдберг установили вирусную этиологию кори.

В 1915 г. Ф. Туортом были открыты вирусы бактерий. В 1917 г. независимо от него вирусы бактерий были открыты Ф. Д'Эрелем, который ввёл термин «бактериофаг».

Вторая волна открытий вирусов антропонозных болезней приходится на 30-е гг. прошлого века. В 1933 г. У. Смит, К. Эндрюс и П. Лейдлоу установили, что грипп вызывают не бактерии, а вирусы. К началу Второй мировой войны к вирусным болезням были причислены эпидемический паротит (К. Джонсон, Э. Гудпасчур, 1934 г.), японский летне-осенний комариный энцефалит (М. Хаяши, А.С. Смородинцев, 1934–1938 гг.), дальневосточный клещевой весенне-летний энцефалит (Л.А. Зильбер, М.П. Чумаков, В.Д. Соловьев и др., 1937 г.), краснуха (Д. Хиро, С. Тасака, 1938 г.). Предположение о вирусной этиологии гепатитов высказали в 1937 г. Г. Финдли и Ф. Мак-Каллум, а подтвердили это в экспериментах на обезьянах и людях-добровольцах в 1943–1944 гг. Д. Камерон, Ф. Мак-Каллум и В. Хавенс.

Первый шаг в направлении описания молекулярной структуры вирусов был сделан в 1935 г., когда В. Стенли получил кристаллы вируса табачной мозаики. Детально изучить тонкую структуру вирусов стало возможным в 50–60 гг. XX века после усовершенствования электронного микроскопа.

В 1938 г. М. Тэйлор получил ослабленную живую вакцину против жёлтой лихорадки. Разработанная вакцина оказалась такой надёжной и эффективной, что используется до сегодняшнего дня. Она спасла миллионы жизней и послужила моделью для разработки многих последующих вакцин. Кроме того, Тейлор усовершенствовал и ввёл в систему использование в качестве восприимчивых животных мышей. В начале 30-х гг. кроме мышей стали использовать также куриные эмбрионы, т.е. появился ещё один источник тканей, чувствительных к заражению вирусами и способных поддерживать их размножение.

По мере совершенствования экспериментальных систем развивались количественные методы исследований. Первый точный и быстрый метод подсчёта пораженных вирусом клеток был разработан в 1941 г., когда Г. Хирст продемонстрировал, что вирус гриппа вызывает агглютинацию эритроцитов.

Развитию вирусологии способствовала разработка метода культур клеток. В 1949 г. в ключевом эксперименте Дж. Ф. Эндерса, Т. Х. Уеллера и Ф. С. Роббинса было показано, что культуры клеток способны поддерживать рост вируса полиомиелита. Это открытие возвестило о приходе эры современной вирусологии и послужило толчком к ряду исследований, которые в конечном итоге привели к выделению многих вирусов, вызывающих серьёзные заболевания у человека. В 50-е и 60-е гг. XX века были вы-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

делены некоторые энтеровирусы и респираторные вирусы, установлены причины большого числа болезней, вирусное происхождение которых до того момента лишь предполагали. Так, например, в 1953 г. М. Блумберг открыл вирус гепатита В и создал против него первую вакцину. В 1952 г. Р. Дюльбекко применил к вирусам животных метод бляшек.

Открытие бактериофагов было оценено лишь в конце 30-х гг., когда вирусы бактерий начали использовать в качестве удобной модели для изучения взаимодействия вирус-клетка в генетических и биохимических исследованиях. В 1939 г. Э. Эллис и М. Дельбрюк выдвинули концепцию «одноэтапного цикла роста вируса». Эта работа заложила основы для понимания характера репродукции вирусов, заключающейся в сборке отдельных компонентов.

Важные для молекулярной биологии открытия были сделаны при использовании в качестве объектов исследований вирусов животных. В 1970 г. Х. М. Темин и Д. Балтимор независимо друг от друга открыли у ретровирусов обратную транскриптазу, способную осуществлять синтез ДНК на матрице РНК. В 1976 г. Д. Бишоп и Х. Вармус обнаружили, что онкоген вируса саркомы Рауса присутствует также в геномах нормальных клеток животных и человека. В 1977 г. Р. Робертс и Ф. Шарп независимо друг от друга показали прерывистую структуру генов аденовирусов. В 1972 г. П. Берг создал первые рекомбинантные молекулы ДНК, построенные на основе кольцевого ДНК-генома вируса SV40 с включением генов фага λ и галактозного оперона *Escherichia coli*. Эта работа дала начало технологии рекомбинантных ДНК. В 1977 г. стала известна первая полная нуклеотидная последовательность генома биологического объекта: Х. Э. Сэнгер с сотрудниками определили нуклеотидную последовательность генома фага ØX174. В 1990 г. была осуществлена первая успешная попытка применения генотерапии в клинической практике: ребёнку, страдающему тяжёлым комбинированным иммунодефицитом, заболеванием, связанным с дефектом гена аденозиндезаминидазы, была введена нормальная копия гена с использованием вектора, построенного на основе генома ретровируса.

В 50–60 гг. также проводились исследования по изучению нетипичных вирусных агентов. В 1957 г. Д. Гайдушек предположил, что болезнь куру вызывается одним из вирусов медленных инфекций. Однако только в 1982 г. была выявлена природа вирусов медленных инфекций («slow virus»), когда С. Прузинер продемонстрировал, что скрепи вызывается инфекционными белками, названными им прионами.

В 1967 г. Т. О. Дайнер открыл вироиды, инфекционные агенты, представляющие собой кольцевые молекулы РНК, вызывающие заболевания у растений.

В последующие годы список открытых вирусов продолжал пополняться. В 1981 г. выделен вирус лейкемии Т-лимфоцитов человека – пер-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

вый вирус, для которого была достоверно установлена способность вызывать рак у человека.

ПРИРОДА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ВИРУСОВ

Представления о природе вирусов со времени их открытия претерпели значительные изменения.

Д.И. Ивановский и другие исследователи того времени подчеркивали два свойства вирусов, позволившие выделить их в отдельную группу живых организмов: фильтруемость и неспособность размножаться на искуственных питательных средах. Позже выяснилось, что эти свойства не абсолютны, так как были обнаружены фильтрующиеся формы бактерий (L-формы) и микоплазмы, не растущие на искусственных питательных средах и по размерам приближавшиеся к наиболее крупным вирусам (вирус оспы, мимивирус, мегавирус, пандоравирус).

Внутриклеточный паразитизм вирусов также оказался не абсолютным критерием, отграничивающим их от остальных микроорганизмов. Внутриклеточными паразитами являются не только вирусы, но и некоторые бактерии и простейшие. А. Львовым был сформулирован основной критерий отличия вирусов от других организмов: генетический материал вирусов представлен одним из двух типов нуклеиновой кислоты – РНК или ДНК, тогда как другие организмы имеют оба типа нуклеиновых кислот. Однако этот критерий не является абсолютным. ДНК-содержащие вирусы в процессе своей репродукции синтезируют информационные РНК, а РНК-содержащие вирусы – ДНК.

Абсолютным и основным критерием, отличающим вирусы от других форм жизни, является отсутствие у них собственных систем синтеза белка. Синтез вирусных белков осуществляется белок-синтезирующим аппаратом клетки. Вирусы вводят в клетку лишь свою генетическую информацию, которая успешно конкурирует с клеточной информацией, несмотря на ничтожно малые размеры вирусных геномов. Поэтому и уровень паразитизма у вирусов иной, чем у бактерий или простейших: в отличие от внутриклеточного паразитизма последних паразитизм вирусов определяется как генетический.

К уникальным свойствам вирусов относится их способ размножения, который резко отличается от способа размножения всех других клеток и организмов. Вирусы не растут, их размножение обозначается как дизъюнктивная репродукция, что подчеркивает разобщенность в пространстве и времени синтеза вирусных компонентов с последующей сборкой и формированием вирионов.

В связи с вышеизложенным не раз возникали дискуссии по поводу того, что же такое вирусы – живое или не живое, организмы или не организмы? Безусловно, вирусы обладают основными свойствами всех других

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

форм жизни – способностью размножаться, наследственностью, изменчивостью, приспособляемостью к условиям внешней среды. Они занимают определенную экологическую нишу, на них распространяются законы эволюции органического мира. К середине 40-х гг. XX века сложилось представление о вирусах как о наиболее примитивных микроорганизмах. Логическим развитием этих взглядов было введение термина «вирион», обозначавшего внеклеточный вирусный индивидуум. Однако с развитием исследований по молекулярной биологии вирусов стали накапливаться факты, противоречащие представлению о вирусах как организмах. Отсутствие собственной белок-синтезирующей системы, дизъюнктивный способ репродукции, интеграция с клеточным геномом, существование вирусных саттелитов и дефектных вирусов, феноменов множественной реактивации и комплементации – все это мало укладывается в представление о вирусах как организмах.

Все вирусы, включая саттелиты и дефектные вирусы, вироиды и прионы, имеют нечто общее, их объединяющее. Все они являются автономными генетическими структурами, способными функционировать и репродуцироваться в восприимчивых к ним клетках различных групп бактерий, грибов, растений и животных. Это наиболее полное определение, позволяющее очертить царство вирусов.

По вопросу о происхождении вирусов высказывались разные предположения. Согласно одной из гипотез, вирусы представляют собой результат регрессивной эволюции свободно живущих клеток. Можно предположить, что внутриклеточный паразитизм благоприятствует утрате способностей к синтезу ряда необходимых метаболитов и не препятствует развитию мутантов, в значительной мере лишенных способности к различным типам синтетических реакций. Такой процесс может зайти настолько далеко, что паразит, в конце концов, потеряет большую часть своих ферментов и генетического материала, что будет сопровождаться уменьшением его размеров и превращением в вирус. В настоящее время эта гипотеза имеет весьма мало сторонников. Наиболее веским аргументом «против» является внеклеточная организация вирусов. Капсиды вирусов морфогенетически подобны клеточным органеллам, состоящим из белковых субъединиц, нитей актина и сходных с ними структур, но не клеточным мембранам. В тех случаях, когда у вирусов имеется оболочка, которая либо заимствована у клетки, либо имеет вирусное происхождение, она отличается по строению от клеточных мембран. В настоящее время данная гипотеза имеет скорее историческое значение и не разделяется большинством вирусологов.

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

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Тем не менее данная гипотеза также не может объяснить разнообразие вирусных геномов и особенности их строения.

Третья гипотеза предполагает, что вирусы произошли от генетических элементов клеток, ставших автономными. Но до конца не ясно, какие из этих элементов дали начало столь большому разнообразию генетического материала. В данном случае проблема происхождения вирусов имеет два аспекта. Первым из них является вопрос о родстве между вирусами и клеточными компонентами, а вторым – вопрос о происхождении компонентов клеток. Наиболее распространено мнение о полифилитическом происхождении нормальной клетки. Вполне можно себе представить, что несколько примитивных самореплицирующихся молекул в какой-то момент времени могли соединиться друг с другом, при этом могла возникнуть благоприятная комбинация, при последующем развитии которой и образовался геном клетки. Точно так же самовоспроизводящиеся свободные зародышевые элементы могли проникнуть в клетку, сохранить часть своих исходных свойств, приобрести в результате мутаций инфекционные свойства и дать начало образованию вирусов. Эта гипотеза, которую назвали гипотезой «взбесившихся генов», находит наибольшее число сторонников.

Например, считается, что крупные ДНК-содержащие вирусы происходят от более сложных (таких как современные микоплазмы и риккетсии) внутриклеточных паразитов, утративших значительную часть своего генома. И действительно, некоторые крупные ДНК-содержащие вирусы кодируют функционально избыточные, на первый взгляд, ферменты, по-видимому, оставшиеся им в наследство от более сложных форм существования. Следует также отметить, что некоторые вирусные белки не обнаруживают никакой гомологии с белками бактерий, архей и эукариот, что свидетельствует о сравнительно давнем обособлении этой группы.

ДНК-содержащие бактериофаги и некоторые ДНК-содержащие вирусы эукариот, возможно, происходят от мобильных элементов, участков ДНК, способных к самостоятельной репликации в клетке.

Происхождение некоторых РНК-содержащих вирусов связывают с вироидами. Вироиды представляют собой кольцевые фрагменты РНК, реплицируемые клеточной РНК-полимеразой и не кодирующие белков. Вироиды иногда называют «сбежавшими интронами» – вырезанными в ходе сплайсинга некодирующими участками информационной РНК, которые случайно приобрели способность к репликации. Предполагают, что приобретение вироидами кодирующих участков (открытой рамки считывания) и привело к появлению первых РНК-содержащих вирусов. И действительно, известны примеры вирусов, содержащих выраженные вироидподобные участки (вирус гепатита Дельта).

Будучи, с одной стороны, автономными генетическими структурами, с другой – неспособными развиваться вне клеток, вирусы на протяжении

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

миллиардов лет биологической эволюции проделали настолько разнообразные пути развития, что отдельные их группы не имеют преемственной связи между собой. По-видимому, вирусы возникали в разные исторические времена из разных генетических элементов клеток, и поэтому существующие в настоящее время группы вирусов имеют полифилетическое происхождение, т.е. не имеют общего предка. Универсальность генетического кода распространяется и на вирусы, свидетельствуя об их биологическом происхождении.

Раздел 2. Объекты изучения вирусологии: вирусы, прионы, вироиды.

ВИРУСЫ

Вирусы являются основным объектом изучения вирусологии и характеризуются следующими основными свойствами:

1. ультрамикроскопические размеры (17 нм – 1 мкм);
2. вирусы содержат нуклеиновую кислоту только одного типа: или ДНК, или РНК. Все другие организмы содержат нуклеиновые кислоты обоих типов, а геном у них представлен только ДНК;
3. вирусы не способны к росту и бинарному делению;
4. вирусы размножаются путем воспроизведения себя из собственной геномной нуклеиновой кислоты. Размножение всех прочих организмов включает стадии бинарного деления клеток;
5. у вирусов отсутствуют собственные системы мобилизации энергии;
6. у вирусов нет собственных белоксинтезирующих систем;
7. в связи с отсутствием собственных систем синтеза белка и мобилизации энергии вирусы являются абсолютными внутриклеточными паразитами.

ПРИОНЫ

Название «прионы» предложил открывший их в 1982 г. С. Прузинер. Прионы – низкомолекулярные, не содержащие нуклеиновых кислот белки, которые вызывают так называемые трансмиссивные губкообразные энцефалопатии. Последние выделены в особую группу медленных летальных прионных инфекций, для которых характерны очень длительный инкубационный период, медленно прогрессирующее течение, дегенеративные изменения в центральной нервной системе, отсутствие признаков воспаления и выраженного иммунного ответа и летальный исход.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Синтез прионов контролирует ген prnP, который несет у человека 20-я хромосома. Установлено 18 различных мутаций этого гена, которые связаны с различными прионовыми болезнями.

Прионы состоят из особого белка, который существует в виде двух изомеров. Один из них нормальный клеточный прионовый протеин – изоформа PrP^c. Он состоит из 254 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 33–35 кД. PrP^c растворим в детергентах, чувствителен к действию протеинкиназы К. Он, как предполагают, участвует в регуляции суточных циклов многих гормонов. У здоровых животных содержание его составляет 1 мкг/г ткани мозга (больше всего его в нейронах).

Другой изомер прионового протеина PrP^{Sc} – аномальный, имеет такую же молекулярную массу. Он отличается от PrP^c вторичной структурой, устойчив к протеолизу, не растворяется детергентами, способен к самоагрегации/олигомеризации. Конверсия PrP^c в PrP^{Sc} происходит очень медленно, но ускоряется в присутствии экзогенного приона. Прионы PrP^{Sc} – возбудители прионных медленных инфекций.

Содержание PrP^{Sc} в ткани мозга больных животных в 10 раз выше, чем у здоровых.

Известны 12 нозологических единиц прионных болезней, из них шесть наблюдаются у животных (скрепи у овец, губкообразные энцефалопатии крупного рогатого скота, экзотических копытных и кошачьих, хроническое истощение лосей и трансмиссивная энцефалопатия норок). Шесть болезней прионной этиологии описаны у человека.

Куру – заболевание, впервые описанное в 1957 г. К. Гайдушеком у папуасов-каннибалов в Новой Гвинее. Характеризуется прогрессирующей мозжечковой атаксией, общим дрожанием, адинамией, а также психическими изменениями (эйфория, беспричинный смех и т. п.).

Болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) встречается повсеместно. Характеризуется прогрессирующей деменцией с симптомами поражения пирамидальных и экстрапирамидальных нервных путей. В 1996 г. началась эпизоотия губкообразной энцефалопатии коров («бешенство» коров) в Англии, а затем в ряде других стран Западной Европы. Она связана с изменением природных схем питания животных: им стали добавлять к пище вещества, полученные из костей и мясных отходов овец и коров. Употребление зараженного мяса таких животных стало причиной заболевания людей БКЯ. В Англии описана новая форма БКЯ (она обозначена как VCJD). Она отличается от БКЯ тем, что ею болеют лица моложе 40 лет, протекает она длительно и часто с развитием нейропатологических изменений, не наблюдаемых при классическом течении болезни.

Летальная семейная бессонница – потеря сна, гиперреактивность симпатической системы, прогрессирующее ослабление автономных и эндокринных циклических временных ритмов; наблюдается у лиц среднего возраста (около 45 лет).

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Синдром Герстманна-Штрейслера (СГШ) – медленная инфекция, зарегистрированная в Великобритании, США, Японии и других странах мира. Характеризуется дегенеративными поражениями центральной нервной системы, которые проявляются в формировании губкообразного состояния, образовании амилоидных бляшек во всем мозге. Болезнь выражается в развитии медленно прогрессирующей атаксии и деменции. Патогенез не изучен. Заболевание тянется длительно и заканчивается смертью.

Амиотрофический лейкоспонгиоз – медленная инфекция человека, характеризующаяся прогрессирующим развитием атрофических парезов мышц конечностей и туловища, нарушением дыхания и летальным исходом.

Синдром Альперса – медленная прионная инфекция. Наблюдается главным образом в детстве, характеризуется симптомами, свидетельствующими о поражении центральной нервной системы.

Скрепи – «чесотка», прионная болезнь овец и коз, характеризующаяся сильным кожным зудом, поражением центральной нервной системы, прогрессирующим нарушением координации движений и неизбежной гибелью животных.

Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота характеризуется поражением центральной нервной системы, нарушением координации движений и неизбежной гибелью животных. Инкубационный период от 1.5 до 15 лет.

Для прионовых болезней человека характерны 4 классических нейропатологических признака: спонгиозные изменения (множество овальных вакуолей диаметром 1–50 мк в сером веществе мозга), потеря нейронов, астроцитоз и формирование амилоидных бляшек.

Предполагается, что прионы играют роль в этиологии шизофрении, миопатии и некоторых других заболеваний человека.

Природа прионов остается неясной. С вирусами их объединяют малые размеры (они способны проходить через бактериальные фильтры) и неспособность размножаться на искусственных питательных средах; специфический круг поражаемых хозяев; длительная персистенция в культуре клеток, полученной из тканей зараженного хозяина, а также в организме больного человека и животного. Вместе с тем они существенным образом отличаются от вирусов: во-первых, у них отсутствует собственный геном, следовательно, они не могут рассматриваться, в отличие от вирусов, как живые существа; во-вторых, они не индуцируют никакого иммунного ответа. В-третьих, прионы обладают значительной резистентностью, чем обычные вирусы, к действию высокой температуры, УФ-излучению, ионизирующей радиации и к различным дезинфектантам; они нечувствительны к интерферонам и не индуцируют их синтез.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

По мнению С. Прузинера, есть два пути передачи аномального приона PrP^{Sc}: наследственный (мутации в гене prnP) и трансмиссивный, или инфекционный (алиментарный и нозокомиальный).

Прионовые болезни в том и другом случае наблюдаются в виде спорадических или групповых заболеваний.

К. Гайдушек в 1976 г. за открытие инфекционной природы прионных болезней и С.Б. Прузинер в 1997 г. за открытие прионов и разработку прионной теории были удостоены Нобелевских премий.

ВИРОИДЫ

В природе помимо фитопатогенных вирусов обнаружены другие очень мелкие инфекционные агенты с необычными свойствами. К ним относятся *вироиды*. Название «вироид» было предложено в 1971 г. Т. Динером. Оно свидетельствует о том, что симптомы заболеваний, которые вызывают эти агенты у различных растений, похожи на симптомы заболеваний, вызываемых у них вирусами. Однако вироиды отличаются от вирусов по крайней мере по следующим признакам. Вироиды имеют очень малые размеры: длина молекулы РНК вироидов равна 1×10^{-6} мм, она состоит из 300-400 нуклеотидов. Вироиды – самые маленькие способные к размножению единицы, известные в природе. Вироиды, в отличие от вирусов, не имеют белковой оболочки и состоят только из инфекционной молекулы РНК. Они не обладают антигенными свойствами и поэтому не могут быть обнаружены серологическими методами. Молекулы вироидов представляют собой одноцепочечные кольцевые РНК. Такую кольцевую структуру имеет еще только один вирус – вирус дельта-гепатита. Молекулы РНК вироидов не кодируют собственных белков, поэтому их размножение может происходить либо аутокаталитически, либо с участием клетки-хозяина. С 1971 г. обнаружено более 10 различных вироидов, отличающихся по первичной структуре, кругу поражаемых хозяев, по симптомам вызываемых ими заболеваний. Все известные вироиды построены по одному плану: 300–400 нуклеотидов образуют кольцо, которое удерживается парами оснований и образует двухцепочечную палочковидную структуру с перемежающимися короткими одно- и двухцепочечными участками. Передача осуществляется горизонтально – от растения к растению механическим путем, вертикально – через пыльцу или семяпочку. Вопрос о природе, происхождении вироидов и о том, каким способом они распространяются, остается открытым. Существует предположение, что вироиды образуются из нормальных клеточных РНК, однако убедительных подтверждений этому не было представлено.

Раздел 3. Морфология и химический состав вирусов.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ

Различают две формы существования вируса – внеклеточную и внутриклеточную.

Внеклеточный вирус называется вирионом. Это конечная фаза развития вируса, не проявляющая жизнедеятельности. Функциями вириона являются сохранение вируса во внешней среде и перенос его из организма в организм и из клетки в клетку.

Внутриклеточный вирус, или вегетативный вирус, репродуцируется в инфицированной клетке, вызывая продуктивный или абортивный тип инфекции (Медицинская вирусология, 2002).

Вирион состоит из геномной нуклеиновой кислоты, окруженной одной или двумя оболочками. По строению вирусы можно разделить на 4 типа, которые различаются по характеру упаковки морфологических субъединиц:

1. вирусы со спиральной симметрией;
2. вирусы с кубической симметрией;
3. вирусы с бинарной симметрией;
4. сложно организованные вирусы, имеющие вторую оболочку.

Оболочка, в которую упакована геномная нуклеиновая кислота, называется капсидом. Наиболее просто организованные вирусы представляют собой нуклеокапсиды. Они состоят из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки, построенной из идентичных пептидных молекул. В природе существует два способа упаковки одинаковых белковых молекул в капсид, при которых он обладал бы стабильностью. Один из вариантов происходит с использованием спиральной симметрии, другой – кубической (рис. 1).

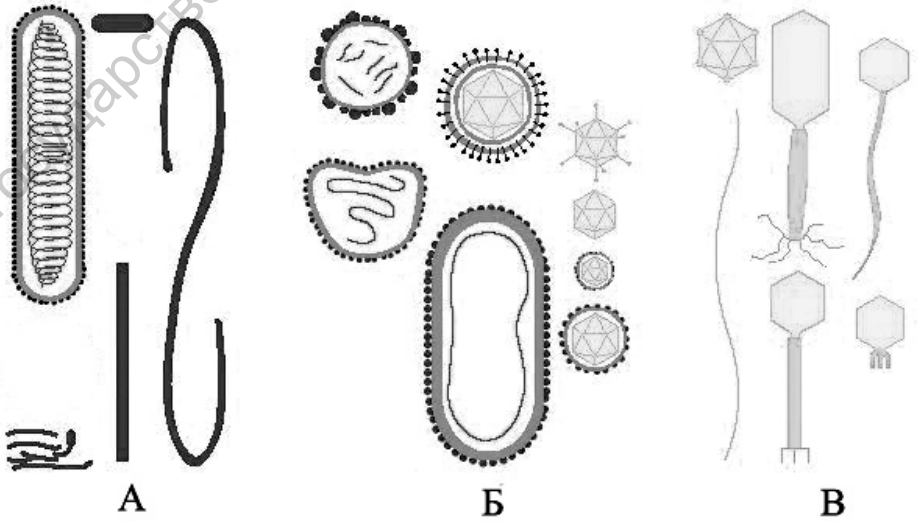

Рис. 1. Типы симметрии вирусных частиц: А – спиральный, Б – кубический, В – смешанный

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

При спиральной симметрии белковые субъединицы располагаются по спирали, а между ними, также по спирали, уложена геномная нуклеиновая кислота. Лучше всего этот тип молекулярной организации вириона изучен у вируса табачной мозаики. При спиральной симметрии белковая оболочка лучше защищает геномную нуклеиновую кислоту, но при этом требуется большее количество белка, чем при кубической симметрии. Спиральная симметрия характеризуется регулярными периодическими взаимодействиями между капсидом и нуклеиновой кислотой.

При кубической симметрии способ упаковки нуклеиновой кислоты геометрически не связан с организацией оболочки. Между капсидом и нуклеиновой кислотой образуются более подвижные связи, чем при спиральной симметрии. В основе данного типа симметрии лежат различные комбинации равносторонних треугольников, образующихся из сочетания шаровидных белковых субъединиц. Взаимодействуя определенным образом друг с другом, они могут формировать замкнутую сферическую поверхность. Из множества сочетаний равносторонних треугольников, которые образуют общую вершину и общую ось симметрии, могут возникать различные варианты многогранников: тетраэдры, октаэдры и икосаэдры. Икосаэдры - самая эффективная и экономичная симметрия, так как в этом случае при сборке используются строительные белки минимального размера, обеспечивается наибольший внутренний объем вириона (табл. 1).

Упаковка по типу икосаэдра позволяет осуществлять переход от структурных единиц (белковых субъединиц) к морфологическим – капсомерам. Например, 60 молекул субъединиц могут быть представлены в виде 30 молекул димеров или 20 молекул тримеров. Число капсомеров для вирусов данного вида является постоянным и имеет диагностическое значение.

Таблица 1

Различия между вирусами со спиральным и кубическим типами симметрии

Свойства вирионов	Вирусы со спиральным типом симметрии	Вирусы с кубическим типом симметрии
Способы самосборки	один	несколько
Взаимодействие между нуклеиновой кислотой и белком	сильное	слабое
Площадь поверхности вириона	большая	малая
Освобождение нуклеиновой кислоты	с разрушением вириона	без разрушения вириона

Более сложно устроены вирусы, у которых имеется вторая оболочка. Вначале она получила название пеплос, позднее ее стали называть суперкапсидом. Он представляет собой обычную биологическую мембрану, со-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

стоящую из двух слоев липидов, имеющих клеточное происхождение, и заключенных в них гликозилированных суперкапсидных вирусных белков, которые выступают над наружной поверхностью вириона в виде своеобразных шипов. Суперкапсидные вирусные белки, образующие шипы, обладают жизненно важными для вируса функциями: распознают клеточные рецепторы и связываются с ними; обеспечивают слияние вирусной мембраны с мембраной клетки и ее лизосом; способствуют распространению вируса в организме за счет слияния клеток; обладают свойствами протективных антигенов.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВИРУСОВ

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

Сложно организованные вирусы имеют дополнительные наружные оболочки, в составе которых содержатся липиды и углеводы, как правило, клеточного происхождения.

Вирусы содержат только один вид нуклеиновой кислоты – либо РНК, либо ДНК. Выполнять функции генома может и та, и другая. Вирусные нуклеиновые кислоты характеризуются поразительным разнообразием форм (рис. 3).

Вирусные ДНК. Молекулярная масса вирусных ДНК варьирует в широких пределах от 1 до 250 МДа. Самые большие вирусные геномы содержат несколько сотен генов, а самые маленькие содержат информацию, достаточную для синтеза нескольких белков. Число нуклеотидов в вирусных ДНК находится в пределах от 3 до 230 тысяч. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой, как одноцепочечной, так и двуцепочечной. Встречаются ДНК с недостроенным участком в одной цепи. Способность к приобретению кольцевой формы имеет большое значение для вирусов. Кольцевая форма обеспечивает устойчивость ДНК к экзонуклеазам. Стадия образования кольцевой формы обязательна для процесса интеграции ДНК с клеточным геномом. Кольцевые формы представляют собой удобный и эффективный способ регуляции транскрипции и трансляции.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

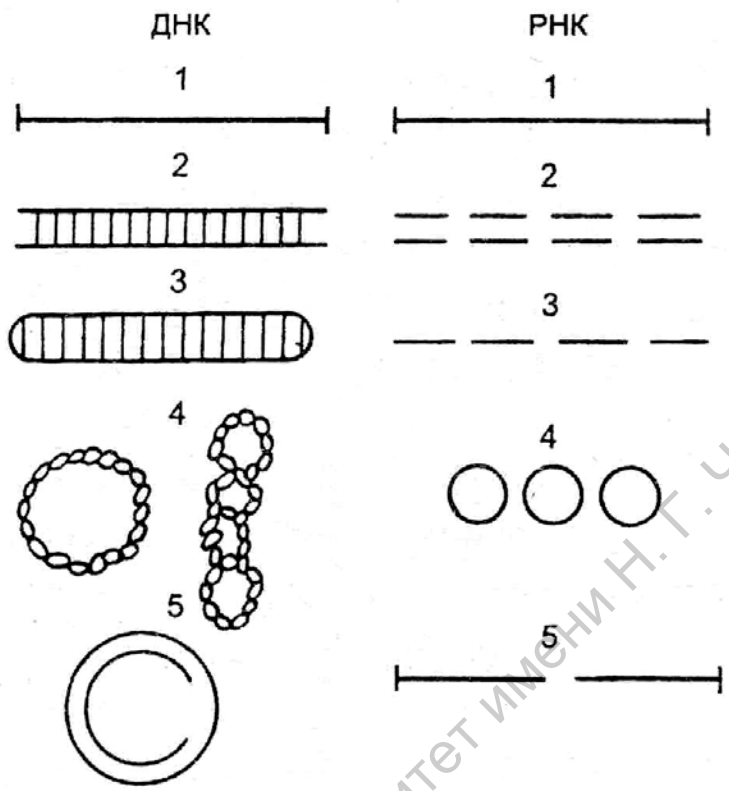

Рис. 2. Типы вирусных нуклеиновых кислот.
ДНК: 1 – линейная, одноцепочечная; 2 – линейная двухцепочечная; 3 – линейная двухцепочечная с замкнутыми концами; 4 – кольцевые (одно-, двухцепочечные); 5 – с недостроенным участком в одной цепи.
РНК: 1 – одноцепочечная нефрагментированная («+»; «-»); 2 –двухцепочечная фрагментированная; 3 – одноцепочечная фрагментированная; 4 –одноцепочечная кольцевая; 5 – двойная одноцепочечная

Вирусные РНК. РНК-геном содержит около 80% известных в настоящее время вирусов. Способность РНК хранить наследственную информацию является уникальной особенностью вирусов. Вирусные РНК могут быть одноцепочечными или двуцепочечными, линейными или кольцевыми, нефрагментированнми или фрагментированными. РНК-геном в основном является гаплоидным, но геном ретровирусов – диплоидный, т.е. состоит из двух идентичных молекул РНК.

Вирусы, содержащие одноцепочечные РНК, делятся на две группы. У вирусов первой группы вирусный геном обладает функциями информационной РНК, т.е. может переносить закодированную в нем информацию на рибосомы. РНК со свойствами информационной обозначается знаком «+», а вирусы содержащие такие РНК называются вирусами с позитивным геномом. Вторая группа РНК-содержащих вирусов содержит геном в виде одноцепочечной РНК, которая не обладает функциями информационной. В этом случае функцию информационной РНК выполняет РНК, комплемен-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

тарная геному. РНК, не обладающая свойствами информационной, обозначается знаком «-», а вирусы, содержащие такие РНК, называются вирусами с негативным геномом.

Вирусные белки. В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез двух групп белков: структурных и неструктурных. Структурные белки входят в состав капсида или суперкапсида. Неструктурные белки обслуживают процесс внутриклеточной репродукции вируса на разных его этапах.

Структурные белки. Количество структурных белков варьирует в широких пределах в зависимости от сложности организации вириона (от 1 до 30). Структурные белки делятся на капсидные и суперкапсидные. Основной функцией капсидных белков является защита вирусного генома от неблагоприятных факторов внешней среды. К капсидным относятся также геномные белки, ковалентно связанные с вирусной нуклеиновой кислотой. Их функции определяются функциями генома и их регуляцией. У некоторых сложно организованных вирусов в составе капсида имеются ферменты, осуществляющие транскрипцию и репликацию вирусного генома (РНК- и ДНК-полимеразы). Суперкапсидные белки (пепломеры) располагаются в липопротеидной оболочке сложно устроенных вирусов. Как правило, суперкапсидные белки гликозилированы. У большинства вирусов гликопротеиды формируют «шипы» на поверхности вириона, длина которых достигает 7–10 нм. Основной функцией гликопротеидов является взаимодействие со специфическими рецепторами клеточной поверхности. Благодаря этим белкам осуществляется распознавание специфических клеточных рецепторов и прикрепление к ним вирусной частицы (адсорбция вируса на клетке). Другой функцией гликопротеидов является участие в слиянии вирусной и клеточной мембран, т.е. в событии, ведущем к проникновению вирусных частиц в клетку.

Неструктурные белки. К неструктурным белкам относятся предшественники вирусных белков, ферменты синтеза РНК и ДНК (РНК- и ДНК-полимеразы), обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома, белки-регуляторы, ферменты, модифицирующие вирусные белки (протеиназы и протеинкиназы).

Липиды. Липиды обнаружены у сложно организованных вирусов и находятся в составе суперкапсида. Примерно 50–60% липидов в составе вирусов представлено фосфолипидами, 20–30% составляет холестерин. Функция липидов заключается в стабилизации вирусной частицы.

Углеводы. Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов. Количество сахаров может достигать 10–13% от массы вириона. Химическая специфичность их полностью определяется клеточными ферментами. Обычными сахарными остатками являются фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, нейраминовая кислота, глюкозамин. Углеводный компонент определяется клеткой-хозяином и играет существенную роль в структуре и функции белков.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Раздел 4. Особенности генетики вирусов. Генетические и негенетические типы взаимодействий у вирусов. Картирование вирусных геномов.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИКИ ВИРУСОВ

Вирусы являются одним из излюбленных объектов молекулярной генетики благодаря простому строению и малой молекулярной массе их геномов. Число генов у вирусов значительно варьирует: от 3–4 у просто организованных вирусов до 150 у сложно устроенных. Геном вирусов является гаплоидным, за исключением ретровирусов, которые имеют диплоидный геном, представленный двумя идентичными молекулами РНК. У вирусов с фрагментарным геномом каждый фрагмент обычно представляет один ген. ДНК-геном ряда вирусов имеет мозаичную структуру, при которой кодирующие смысловые последовательности (экзоны) чередуются с неинформативными (интронами). В составе генов ДНК-содержащих вирусов имеются регуляторные участки, в том числе промоторы, контролирующие функции структурных генов. Промоторы используются в генной инженерии для усиления транскрипции изучаемого гена.

Способы увеличения информационной емкости вирусного генома.

Для вирусов характерно функционирование различных механизмов, позволяющих получить развернутую генетическую информацию при максимальной экономии генетического материала. Подобные механизмы выработаны в процессе эволюции вирусов как генетических паразитов. Способами увеличения генетической информации у вирусов являются:

1. двукратное считывание одной и той же информационной РНК, но с другого инициирующего кодона;
2. сдвиг рамки трансляции;
3. сплайсинг – вырезание интронов после транскрипции генов;
4. нарезание белков-предшественников.

В составе мРНК обычно встречается несколько инициирующих кодонов. Малая рибосомальная единица связывается с мРНК около 5’-конца и скользит вниз до встречи с инициирующим кодоном. Однако инициация в большинстве случаев происходит не с первого инициирующего кодона, а с последующих АУГ-кодонов. Нужный функционирующий АУГ-кодон узнается рибосомой благодаря окружающим его «фланкирующим» последовательностям. Однако некоторые рибосомальные субъединицы начнут инициацию с первого АУГ-кодона. В этом случае одна мРНК может направлять синтез двух белков разной длины.

Трансляция вирусных белков может происходить без сдвига рамки и со сдвигом рамки считывания. Генетический код является триплетным: три нуклеотида, составляющих триплет, кодируют одну аминокислоту. Ес-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ли триплеты сохранены, и генетический код не изменился, то при трансляции с двух разных инициирующих кодонов будут синтезироваться полипептиды, представляющие собой укороченную копию первого пептида (трансляция без сдвига рамки).

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

Сплайсинг со сдвигом рамки известен у ряда вирусов. Механизм сплайсинга широко распространен среди вирусов, имеющих ядерную локализацию транскрипции. Сплайсинг обнаружен также у РНК-содержащих вирусов.

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

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

Процессы, контролирующие наследственность и изменчивость вирусов.

Модификации. Модификациями называют эволюционно закрепленные адаптивные реакции организма в ответ на изменение условий внешней среды при неизменном генотипе, обусловленные у вирусов клеткой-хозяином. Модификации нуклеиновых кислот вирусов осуществляют клеточные ферменты, ответственные за ограничение репродукции вируса. Характерными особенностями модификаций являются массовый характер изменений и адекватность изменений воздействиям внешней среды.

Мутации. Мутации – внезапные стабильные наследуемые изменения структуры гена. Судьба мутантов зависит от естественного отбора, сохраняющую популяцию, наиболее приспособленную к условиям существования.

По своему происхождению мутации бывают спонтанными и индуцированными. Спонтанные мутации возникают с низкой частотой. Однако некоторые вирусы дают значительную долю мутантов при пассировании в отсутствие каких-либо мутагенов. Спонтанные мутации накапливаются в геномах вирусов и приводят к изменчивости фенотипа. Скорости спонтанного мутагенеза в ДНК-геномах низкие: 10^{-8}–10^{-11} на каждый включенный нуклеотид. У РНК-содержащих вирусов скорости спонтанного мутагенеза значительно выше: порядка 10^{-3}–10^{-4} на каждый включенный нуклеотид. Это обусловлено низкой точностью репликации РНК-геномов.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Большая часть мутантов, выделенных в ходе исследования вирусов, получена из популяций дикого типа, обработанных мутагенами. Мутагены обычно применяют для того, чтобы увеличить частоту мутаций в популяции, после чего мутанты подвергают скринингу с помощью подходящего селективного давления. Основной проблемой, связанной с использованием мутагенов, является подбор подходящей дозы, так чтобы частота мутаций с требуемым фенотипом увеличивалась, но вероятность множественных мутаций в индивидуальном геноме была минимальна. Поскольку применение большинства мутагенов приводит к потере инфекционности, для каждой комбинации вирус – клетка – мутаген следует получать кривую зависимости действия от дозы мутагена.

Выбор мутагена определяется типом мутации, которую желательно получить, а также эффективностью мутагена в отношении данного вируса. В системах с вирусами было использовано множество различных мутагенов, но все они входят в небольшое число классов, определяемых по механизму мутагенеза. К химическим мутагенам относятся азотистая кислота, гидроксиламин, нитрозогуанидин, этанметансульфонат и метилметансульфонат, 2-аминопурин, 5-бромдезоксиуридин и 5-азацитидин, профлавин.

Простым и удобным методом получения мутантов является УФ-облучение. Основным результатом воздействия ультрафиолета на нуклеиновую кислоту является образование пиримидиновых димеров. В ДНК пиримидиновые димеры вырезаются, и считают, что мутации обусловлены неправильным включением оснований в процессе репарации. Для РНК механизм ультрафиолетового мутагенеза неизвестен.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И НЕГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У ВИРУСОВ

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

Рекомбинация – обмен генетическим материалом между вирусными геномами в смешанно-зараженной клетке. В результате рекомбинации возникают дочерние геномы, которые содержат генетическую информацию в сочетании, отсутствующем у родителей. У вирусов, имеющих одну геномную молекулу, включая все ДНК-содержащие вирусы и часть РНК-содержащих вирусов, рекомбинация включает разрыв и воссоединение ко-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

валентной связи в нуклеиновой кислоте с образованием дочерних геномов неродительского типа (внутримолекулярная рекомбинация). У вирусов с сегментированным геномом в ходе рекомбинационного процесса ковалентные связи не разрываются. Вместо этого сегменты генома перемешиваются случайным образом при помощи механизма, называемого перетасовыванием, или реассортацией.

Реактивация происходит в том случае, если у одного из вирусов часть генома повреждена, а геном другого вируса интактен. Реактивацию между инфекционным и неинфекционным вирусами называют кроссреактивацией. В условиях, когда оба партнера неинфекционны, реактивацию называют множественной. Множественная реактивация может осуществляться только в том случае, если инактивирующие повреждения локализованы в различных участках генома, так что обмен сегментатами или рекомбинация могут дать жизнеспособное потомство.

Гетерозиготность. При совместном культивировании двух различных вирусов может происходить формирование вирионов, содержащих в своем составе два разных генома или один полный геном и часть второго генома.

Комплементацией называют взаимодействие генных продуктов вируса в смешанно-инфицированных клетках, которое приводит к увеличению выхода одного или обоих вирусов, в то время как их генотип остается неизменным. Это определение отражает тот факт, что один или оба вируса предоставляют белковый продукт, по которому другой партнер дефектен, что позволяет одному или обоим мутантам расти в смешанно-инфицированных клетках. Существуют два типа комплементации. Наиболее типична неаллельная, или межгенная, комплементация, при которой вирусы, дефектные по различным функциям, помогают друг другу в репликации, предоставляя функцию, дефектную у другого вируса. Аллельная, или внутригенная, комплементация наблюдается намного реже и происходит в том случае, если генный продукт, дефектный у обоих партнеров, образует мультимерный белок. В этом случае различные партнеры имеют дефект в разных доменах одного и того же белка. Если мультимерный белок состоит из субъединиц одного партнера, то он функционально неактивен. Однако, если мультимер состоит из субъединиц от обоих партнеров, он может принять функционально активную конформацию, и будет наблюдаться комплементация.

Фенотипическое смешивание – процесс, в результате которого индивидуальная вирусная частица, образовавшаяся при смешанной инфекции, получает белки от обоих родительских вирусов. В крайнем варианте дочерний геном, идентичный геному одного из родителей, упаковывается в капсид или суперкапсид, определяемые другим родителем.

КАРТИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

В настоящее время в генетике вирусов используют генетические, физические, транскрипционные и трансляционные карты.

Генетические карты, в которых вирусные мутации расположены в определенном линейном порядке с указанием относительных расстояний между ними, получают путем рекомбинационного анализа. На генетической карте можно видеть относительное положение специфических мутаций в геноме, но она не дает никакой информации о генах, расположенных в соответствующих участках генома.

Физические карты геномов ДНК-содержащих вирусов создаются с использованием рестрикционных эндонуклеаз. Стратегия рестрикционного картирования состоит в расщеплении хромосомной ДНК подходящим ферментом и последующем определении размера и порядка расположения образующихся фрагментов в хромосоме. После этого контрольные точки, представляющие собой сайты расщепления на рестрикционной карте, можно использовать для картирования разнообразных молекулярных маркеров. Подробные рестрикционные карты с использованием довольно большого числа рестрикционных эндонуклеаз были составлены для всех ДНК-содержащих вирусов. Рестрикционное картирование выявило особенности организации геномов ДНК-содержащих вирусов.

Транскрипционное картирование основано на определении участков генома, кодирующих специфические информационные РНК.

Трансляционные карты получают в результате добавления к зараженным клеткам химических веществ, подавляющих инициацию белкового синтеза, но разрешающих продолжаться синтезу уже инициированной белковой цепи.

Раздел 5. Репродукция вирусов. Основные этапы жизненного цикла вирусов.

РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ

Репродукция вирусов (жизненный цикл вирусов) – внутриклеточный процесс размножения вируса. Жизненный цикл вирусов начинается с их адсорбции на мембране клетки-мишени и заканчивается выходом вновь синтезированных вирионов из клетки. Цикл включает в себя следующие стадии: адсорбция, проникновение вируса в клетку, раздевание, внутриклеточное размножение (транскрипция, трансляция, репликация, сборка вирусных частиц), выход вируса из клетки.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВИРУСОВ

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Адсорбция. Адсорбция вируса на мембране клетки является пусковым моментом в реализации его патогенных свойств. Для каждого вида вируса на мембране клеток существуют специфические рецепторы, с которыми вирусы связываются с помощью белков-антирецепторов. Узнавание клеточных рецепторов вирусными белками является высоко специфичным процессом. Вирусы используют рецепторы, предназначенные для прохождения в клетку необходимых для ее жизнедеятельности веществ: питательных веществ, гормонов, факторов роста и т.д. Рецепторы могут иметь разную химическую природу и представлять собой белки, углеводный компонент белков и липидов, липиды. Специфические рецепторы играют роль не только в прикреплении вирусной частицы к клеточной поверхности, но и определяют внутриклеточный транспорт и доставку вируса в определенные участки цитоплазмы и ядра. Наличие у клеток и вирусов соответствующих рецепторов лежит в основе органотропности.

Проникновение вируса в клетку. Проникновение вируса в клетку сопряжено с одновременным разрушением суперкапсидных и капсидных белков и высвобождением геномной нуклеиновой кислоты. Известны два механизма проникновения вируса в клетку. В основе первого лежит слияние суперкапсида вируса с мембраной клетки. Благодаря этому происходит высвобождение нуклеокапсида в цитоплазму с последующей реализацией свойств вирусного генома. Слияние мембран способны вызывать мембранные гликопротеины. Другой механизм получил название рецепторопосредованного эндоцитоза. С помощью рецепторного эндоцитоза вирусы захватываются в эндосомные везикулы (эндосомы). При этом нуклеиновая кислота вируса все еще остается отделенной от цитоплазмы двумя мембранами – вирусной и эндосомной. Эндосома сливается с лизосомой. Благодаря особым свойствам вирусных суперкапсидных белков происходит слияние липидных слоев суперкапсида и мембраны лизосомы, и выход вирусной нуклеиновой кислоты в цитоплазму клетки.

После проникновения вируса в клетку происходит его раздевание, т. е. удаление капсида или его части клеточными или вирусными ферментами для дальнейшей экспрессии вирусных функций. Раздевание сопровождается рядом характерных особенностей: исчезает инфекционная активность вируса, появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к действию антител. Конечными продуктами раздевания являются нуклеокапсиды или нуклеиновые кислоты.

Внутриклеточное размножение вируса. Внутриклеточное размножение вируса включает в себя целую серию последовательных событий, заканчивающихся формированием зрелых вирионов и выходом их из клетки. Существуют некоторые общие закономерности размножения вирусов. Все РНК-содержащие вирусы, кроме вирусов гриппа и ретровирусов, размножаются в цитоплазме. Для своего размножения вирусы гриппа А и В и ретровирусы проникают в ядро, что связано с особенностями поведения их

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

генома. Размножение практически всех ДНК-содержащих вирусов протекает как в ядре (транскрипция и репликация геномных нуклеиновых кислот), так и в цитоплазме (трансляция и процессинг вирусных белков, морфогенез вирионов). Лишь размножение поксвирусов происходит в цитоплазме клетки, поскольку они обладают собственными системами транскрипции.

Особенности репликации вирусной нуклеиновой кислоты определяются ее типом. Репликация двунитевой ДНК происходит по обычному механизму полуконсервативной репликации: нити нуклеиновой кислоты разделяются и на каждой из них с помощью фермента ДНК-зависимой ДНК-полимеразы достраивается комплементарная ей нить. В зараженной клетке фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза транскрибирует с генома этих вирусов молекулы матричной РНК, которые направляют синтез белков. В некоторых случаях производством вирусных матричных РНК и ДНК занимаются клеточные ферменты, другие вирусы используют собственные ферменты.

Репликация однонитевой ДНК происходит через образование вначале репликативной формы, которая возникает в результате синтеза на исходной вирионной ДНК комплементарной ей, т. е. однонитевая ДНК превращается в двунитевую структуру.

Позитивная однонитевая РНК вирусов, попав в клетку, прежде всего, обеспечивает синтез вирусных белков. Лишь после этого начинается размножение самих молекул вирусной РНК, которое невозможно без предварительного образования соответствующего вирусного фермента (РНК-зависимой РНК-полимеразы), способного синтезировать молекулы РНК без участия ДНК. Вначале на вирусной РНК синтезируются комплементарные ей РНК. Затем на этой нити РНК синтезируется комплементарная ей, но идентичная исходной вирусной РНК.

Вирусы, геном которых представлен негативной однонитевой РНК, для реализации жизненных функций вводят в заражаемую клетку не только свой геном, но и ферменты (РНК-зависимая РНК-полимераза). Инфекционный процесс начинается с того, что вирусный фермент копирует вирусную РНК, образуя комплементарные молекулы РНК (позитивные РНК). Далее начинается процесс трансляции.

У некоторых вирусов наследственная информация хранится в виде двуцепочечной РНК. Вместе с вирусной РНК в клетку попадает и вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза, которая обеспечивает синтез молекул позитивной РНК, которая обеспечивает производство вирусных белков и служит матрицей для синтеза новых негативных РНК вирусной РНК-полимеразой. Цепочки «+» и «-» РНКобразуют двунитевовй РНК-геном.

Репликация однонитевой РНК ретровирусов происходит с участием обратной транскриптазы (ревертазы). Вначале на вирусной РНК обратная транскриптаза синтезирует комплементарную ей «-» цепь ДНК, а затем на

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ней – «+» нить ДНК. Двунитевая ДНК интегрируется в хромосому клетки и там служит матрицей для синтеза разных классов вирусных РНК. Таким образом, репликация ретровирусов происходит по схеме: РНК – ДНК – РНК.

Трансляция. Нуклеокапсидные белки вирусов синтезируются на свободных полирибосомах (не связанных с мембраной), а суперкапсидные белки на рибосомах, ассоциированных с мембранами. Кроме того, белки некоторых вирусов подвергаются протеолитическому процессингу и гликозилированию. Различают два типа протеолитического процессинга: каскадный и точечный. При каскадном протеолизе вновь синтезированный вирусный полипептид-предшественник подвергается последовательному «нарезанию» с образованием более коротких полипептидов, часть из которых дополнительно разрезается на более мелкие субъединицы. Ряд ступеней такого каскадного протеолиза осуществляется определенной областью самого полипротеина, обладающего протеазной активностью. При точечном протеолизе разрезанию подвергается один (реже несколько) из вирусных полипептидов. Разрезание происходит, как правило, в определенном участке полипептида. Такой тип протеолиза необходим для того, чтобы определенный белок вируса приобрел свою специфическую активность.

Еще одна особенность вирусов, обладающих суперкапсидом, заключается в том, что суперкапсидные белки подвергаются в ходе своей транспортировки на наружную поверхность клеточной мембраны модификациям (гликозилирование, ацилирование, метилирование, сульфирование, фосфорилирование).

Сборка вирусных частиц. В основе самосборки лежит специфическое белокнуклеиновое и белок-белковое узнавание, которое может происходить в результате гидрофобных и водородных связей, а также стерического соответствия. Вирусы с определенным типом строения характеризуются определенным способом сборки вирионов.

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

2. Сборка сложно устроенных вирусов (за исключением вирусов оспы) осуществляется на клеточных мембранах. Сборка ядерных вирусов происходит с участием ядерных мембран, сборка цитоплазматических вирусов – с участием мембран эндоплазматической сети или плазматической мембраны.

3. У ряда сложно устроенных вирусов существуют специальные гидрофобные белки, выполняющие функции посредников между сформированными нуклеокапсидами и вирусными оболочками.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

4. Сложно устроенные вирусы для построения своих частиц используют элементы клетки-хозяина, например, липиды, ферменты, гистоны, актин, рибосомы.

Выход вируса из клетки. Заключительным этапом внутриклеточного размножения является выход вновь синтезированных вирионов из клетки. Существуют два способа выхода вирусного потомства из клетки: путем взрыва и путем почкования. Выход из клетки путем взрыва связан с деструкцией клетки, нарушением ее целостности, в результате чего находящиеся внутри клетки вирусные частицы оказываются в окружающей среде. Такой способ выхода из клетки характерен для вирусов, не содержащих липопротеидной оболочки. Выход из клеток путем почкования присущ вирусам, содержащим нуклеокапсидную оболочку. При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство, пока не произойдет полное истощение ее ресурсов.

Раздел 6. Бактериофаги: строение, жизненный цикл, практическое использование.

СТРОЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Бактериофаги – вирусы бактерий. Их геном представлен либо ДНК, либо РНК. В вирионах большинства ДНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота двуцепочечная, но в некоторых случаях ДНК бывает одноцепочечной. В вирионах всех известных РНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота одноцепочечная. Геном фага заключен в белковую оболочку (капсид), структурные субъединицы которой уложены по типу либо спиральной (фаг fd), либо кубической симметрии. Крупные фаги, имеющие хвостик, устроены по типу бинарной симметрии (головка – икосаэдр, хвостик – спиральная симметрия). Фаги различаются по форме – нитевидные, сферические; фаги, имеющие головку и хвостик; по размерам – мелкие, среднего размера и крупные. Чем крупнее фаги, тем больше у них генов и сложнее их жизненный цикл. К самым маленьким относится нитевидный фаг M13, геном которого (однонитевая кольцевидная молекула ДНК с м.м. 2МД) содержит 8 генов.

Наиболее сложно устроены крупные фаги, состоящие из головки и хвостика. У энтеробактерий обнаружено более 500 фагов, из них более 140 состоят из головки и хвостика. Например Фаг Т2, который паразитирует у *Escherichia coli* имеет следующую структуру: 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 спирали; каждая бел-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ковая молекула содержит одну молекулу АТФ-азы и ион Ca^{2+}. Белок актиноподобный и способен сокращаться. В пластинке и шипах содержится лизоцим. Кроме того, хвостик имеет 6 ворсинок. У неактивного фага они свернуты и сложноэфирными связями прикреплены к белкам чехла. В момент адсорбции ворсинки раскрываются и обеспечивают плотное прикрепление фага к бактериальной клетке. Основное назначение хвостика - обеспечение адсорбции фага на клетке. Длина хвостика сильно варьирует. В тех случаях, когда хвостик содержит белковый чехол, последний, благодаря своему сокращению, обеспечивает проникновение стержня через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану (рис. 4).

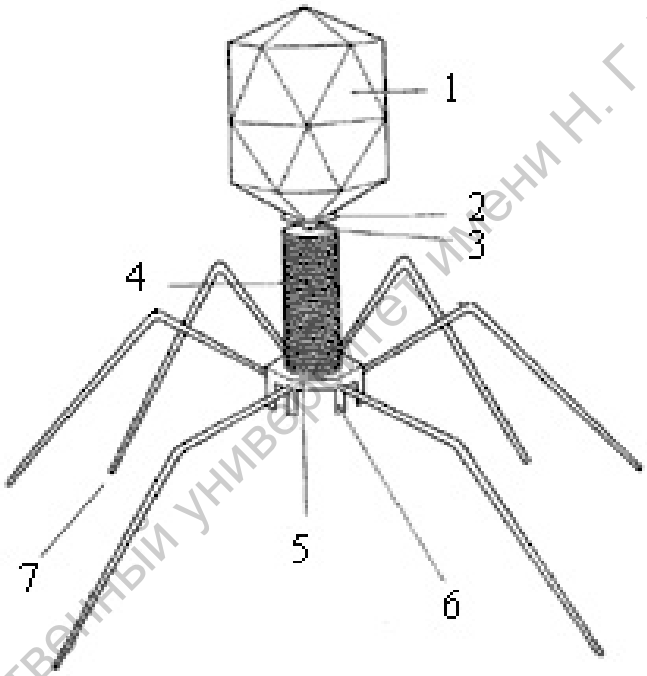

Рис. 3. Строение бактериофага Т4: 1 – головка; 2 – воротничок; 3 – стержень; 4 – чехол; 5 – базальная пластинка; 6 – шипы отростка; 7 – хвостовые нити.

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ БАКТЕРИОФАГОВ

Различают фаги инфекционные, т. е. способные вызвать разные формы фаговой инфекции, и неинфекционные (вегетативные), или незрелые фаги, находящиеся еще в стадии размножения. В свою очередь инфекционные фаги разделяют на:

1. покоящиеся (находящиеся вне клетки),
2. вирулентные (способные вызвать продуктивную форму инфекции),
3. умеренные (способные вызывать не только продуктивную, но и редуктивную фаговую инфекцию).

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Жизненный цикл фага может проявляться в форме:

1. продуктивной инфекции (фаг размножается в клетке и выходит из нее),

2. редуктивной инфекции (геном фага проникает в клетку, однако размножения фага не происходит, его геном интегрируется в хромосому клетки-хозяина, становится ее составной частью, т. е. фаг превращается в профаг, а клетка становится лизогенной),

3. абортивной инфекции, при которой взаимодействие фага с клеткой обрывается на какой-то стадии жизненного цикла фага, и он погибает.

Клетка, несущая профаг, называется лизогенной, потому что профаг, передающийся клеткой по наследству, может выйти из хромосомы, активироваться и вызвать продуктивную форму инфекции.

Если в результате лизогении, т. е. внедрения профага в хромосому клетки-хозяина, она получает новые наследуемые признаки, такую форму ее изменчивости называют лизогенной конверсией, т. е. изменчивостью, обусловленной лизогенией.

Жизненный цикл фага (Т-четные фаги), сопровождающийся продуктивной инфекцией, складывается из 6 последовательных стадий, каждая из которых состоит из нескольких этапов.

Адсорбция фагов на клеточной поверхности бактерий при помощи специфических рецепторов (белков-лоцманов), которые располагаются на кончике нити, шипа или хвостика. В свою очередь, на клеточной стенке бактерии располагаются ее фагоспецифические рецепторы, распознаваемые фагом. Рецепторы для одних фагов находятся в липопротеидном слое клеточной стенки, для других – в липополисахаридном слое. Для ряда фагов рецепторы находятся на жгутиках или пилях. Адсорбция фага – пусковой момент его жизненного цикла. Она очень специфична и поэтому обусловливает возможность практического использования фагов, например, для идентификации бактерий, а также для лечебных и профилактических целей.

Пластинка со своими шипами прикрепляется к стенке; содержащийся в них лизоцим вызывает в месте контакта лизис клеточной стенки. Одновременно ионы Ca^{2+} активируют содержащуюся в белках чехла АТФ-азу, и чехол сокращается. Его длина уменьшается в 2 раза, количество витков, также уменьшается в 2 раза – вместо 24 их становится 10–12. В результате сокращения чехла внутренний стержень прокалывает клеточную стенку в участке, разрушенном лизоцимом, и цитоплазматическую мембрану. Прокалывание происходит в участках напротив зон адгезии цитоплазматической мембраны и нижнего слоя пептидогликана. Таких зон около 200–300, их размер 20–30 нм.

Внедрение фаговой ДНК в клетку происходит с помощью следующих механизмов:

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

1. около 10 % ее активно впрыскивается во время сокращения чехла хвостика;

2. остальная часть фаговой ДНК втягивается в цитоплазму бактерий благодаря процессам транскрипции и работе трансляционного аппарата.

Белки капсида остаются снаружи клеточной стенки.

Однако у некоторых фагов механизм проникновения совершенно иной. У нитевидных (спиральных) фагов, содержащих одноцепочечную ДНК, основной белок спирального капсида проходит через клеточную стенку и остается на клеточной мембране, а минорный белок оболочки проникает вместе с фаговой ДНК в цитоплазму.

Проникновение фагового генома через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану внутрь клетки и освобождение его от оболочки (раздевание фага). Сразу после того, как фаговая ДНК попадает в цитоплазму клетки, РНК-полимераза клетки начинает транскрибировать некоторые ее гены и образуются ранние вирусные информационные РНК. Затем рибосомы клетки-хозяина транслируют эти вирусные мРНК, образуя целый ряд новых ферментов, включая и ферменты, необходимые для репликации фаговой ДНК. Многие вирусы, в отличие от Т-четных фагов, обеспечиваются некоторыми важными ферментами за счет генома клетки-хозяина.

В случае РНК-содержащих бактериофагов молекула РНК проникает в цитоплазму клетки, распознается рибосомами как информационная. Рибосомы связываются с ней и синтезируют вирусные белки (в том числе РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая осуществляет репликацию вирусной РНК.).

Репликация фаговой геномной ДНК или РНК, которая протекает в соответствии с общим механизмом репликации. Степень зависимости репликации ДНК фага от хромосомы клетки определяется набором генов у фагов. Крупные фаги, например Т4, осуществляют репликацию полностью автономно; средние – частично нуждаются в помощи бактериальных генов, а мелкие (М13) почти полностью зависят от хромосомных генов.

Установление фагового генома с помощью белка-лоцмана для реализации содержащейся в геноме информации:

1. однонитевая ДНК – к репликативному аппарату для синтеза комплементарной ей нити и образования репликативной формы; далее ее поведение аналогично двунитевой ДНК;

2. двунитевая ДНК – к транскрипционному аппарату для синтеза мРНК и последующей трансляции вирусспецифических белков (ферментов и структурных);

3. РНК-геном – к трансляционному аппарату для синтеза вирусспецифических белков (ферментов репликации и структурных).

После начала репликации начинается синтез поздних вирусных информационных РНК. В результате трансляции поздних мРНК образуется

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

второй набор вирус-специфических белков, в том числе субъединицы вирусного капсида. Сборка вновь синтезированных вирионов – заключение геномной НК в белковую оболочку, морфогенез фагов. Особенности морфогенеза фагов. Морфогенез мелких фагов протекает по типу самосборки. У крупных фагов этот процесс носит более сложный характер. Например, морфогенез фага Т4 требует активности более чем 40 генов и протекает при участии трех самостоятельных линий. На одной из них происходит сборка хвостика (участвует около 20 генов), на другой - головки фага (не менее 16 генов) и на третьей - сборка ворсинок (5 генов). Соединение хвостика с головкой не требует участия генов, однако оно не может произойти до тех пор, пока и хвостик, и головка не будут смонтированы полностью. Точно так же ворсинки могут присоединяться к хвостику только после того, как он соединится с полностью готовой головкой. Благодаря строгому генетическому контролю со стороны фага обеспечивается последовательность и согласованность всех процессов его внутриклеточного размножения.

Выход вновь синтезированных фагов из клетки происходит:

1. путем почкования (М13 – единственный фаг, не вызывающий при выходе из клетки ее гибели);

2. путем лизиса клетки изнутри. Он осуществляется лизоцимом и вызывает гибель клетки. Лизоцим синтезируется как поздний вирус-специфический белок. Он воздействует на пептидогликановый слой стенки бактериальной клетки, в результате стенка разрывается, фаговое потомство выходит из клетки. Иногда происходит лизис бактерий извне как следствие адсорбции многих фагов на одной клетке, но при этом размножения фагов не происходит.

Обычно же после внедрения фагового генома в клетку у нее возникает состояние иммунитета к суперинфекции данным фагом, т. е. проникновение других фаговых геномов становится невозможным. Иммунитет обеспечивается особым цитоплазматическим репрессором.

Редуктивная инфекция. Ее вызывают только умеренные фаги. В этом случае их жизненный цикл складывается из следующих стадий:

1. адсорбция фага на поверхности клетки;
2. проникновение фаговой ДНК в бактериальную клетку;
3. сайт-специфическая интеграция фаговой ДНК в хромосому клетки-хозяина и превращение фага в профаг.

Если первые две стадии протекают так же, как в случае продуктивной инфекции, то третья требует участия дополнительных фаговых и хозяйских генов.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

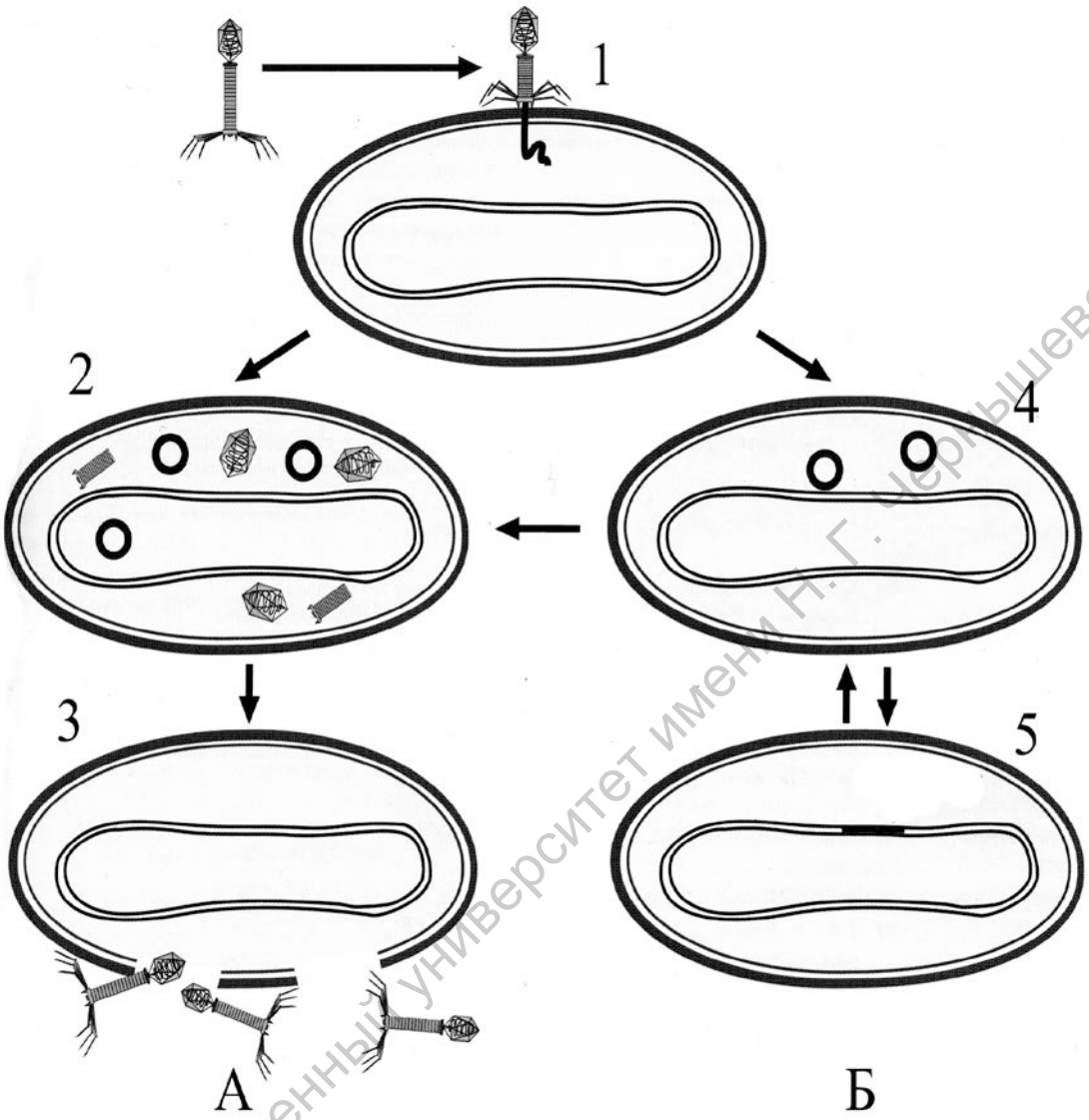

Рис. 4. Жизненный цикл бактериофага. А – продуктивная инфекция, Б – редуктивная инфекция. 1 – Адсорбция фага и проникновение его нуклеиновой кислоты в клетку; 2 – синтез вирусных компонентов; 3 – сборка вирусных частиц и выход их из клетки; 4 – встраивание вирусной НК в геном клетки; 5 – переход вируса в состояние профага

Мутагенная роль бактериофагов

Умеренные фаги играют важную роль в обмене генетическим материалом между бактериями. Этот процесс получил название трансдукции. Различают общую (генерализованную, или неспецифическую) и специфическую трансдукцию.

Общая трансдукция. Механизм ее заключается в том, что в процессе внутриклеточного размножения фага в его головку может быть случайно включен вместо фаговой ДНК фрагмент бактериальной ДНК, равный по длине фаговой. Это вполне возможно, так как в инфицированной клетке биосинтез ее ДНК блокирован, а сама ДНК подвергается распаду. Таким образом, в процессе репродукции фага возникают дефектные вирионы, у

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

которых в головках вместо собственной геномной ДНК содержится фрагмент ДНК бактерии. Такие фаги сохраняют инфекционные свойства. Они адсорбируются на бактериальной клетке, вводят в нее ДНК, содержащуюся в головке, но при этом размножения фага не происходит. Введенная в клетку реципиента донорная ДНК (фрагмент хромосомы донора), если она содержит гены, отсутствующие у реципиента, наделяет его новым признаком. Этот признак будет зависеть от того, какой ген (гены) попал в головку трансдуцирующего фага. В случае рекомбинации привнесенного фагом фрагмента ДНК донора с хромосомой клетки-реципиента этот признак наследственно закрепляется.

Специфическая трансдукция отличается от неспецифической тем, что в этом случае трансдуцирующие фаги всегда переносят только определенные гены. Специфическая трансдукция всегда связана с интеграцией умеренного фага в хромосому клетки-хозяина. При выходе (исключении) из хромосомы профаг может захватить ген с левого или правого фланга, но в этом случае он должен лишиться такого же размера своей ДНК с противоположного конца, чтобы ее общая длина оставалась неизменной (иначе она не может быть упакована в головку фага). Поэтому при такой форме исключения образуются дефектные фаги.

Специфическую трансдукцию у *E. coli* осуществляет не только фаг λ, но и родственные ему лямбдоидные и другие фаги. Трансдуцирующий фаг в случае инфицирования реципиентной клетки интегрируется в ее хромосому и привносит в нее новый ген (новый признак), опосредуя не только лизогенизацию, но и лизогенную конверсию. Таким образом, если при неспецифической трансдукции фаг является только пассивным переносчиком генетического материала, то при специфической фаг включает этот материал в свой геном и передает его, лизогенизируя бактерии, реципиенту. Однако лизогенная конверсия может произойти и в том случае, если геном умеренного фага содержит такие собственные гены, которые у клетки отсутствуют, но отвечают за синтез существенно важных белков. Например, способностью вырабатывать экзотоксин обладают только те возбудители дифтерии, в хромосому которых интегрирован умеренный профаг, несущий оперон tox. Он отвечает за синтез дифтерийного токсина. Иначе говоря, умеренный фаг tox вызывает лизогенную конверсию нетоксигенной дифтерийной палочки в токсигенную.

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ

1. Диагностические системы. Определенный вид бактерий может быть чувствительным к одному или нескольким фагам. Спектр чувствительности возбудителя к фагам называют фаготипом. Наборы стандартных фагов, в том числе международные, используются для типирования и идентификации возбудителей ряда заболеваний.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

2. Терапия и профилактика инфекционных заболеваний. Бактериофаги для профилактики (фагопрофилактики) и лечения некоторых бактериальных инфекций. В последнее время интерес к ним возрос в связи с широким распространением лекарственно-устойчивых форм патогенных и условно-патогенных бактерий. Препараты бактериофагов выпускают в виде таблеток, мазей, аэрозолей, свечей, в жидком виде. Употребляют их для орошения, смазывания раневых поверхностей, вводят перорально, внутривенно и т. д. Существуют такие лечебно-профилактические фаги как стафилококковый, стрептококковый, дизентерийный, брюшнотифозный, сальмонеллезный, колифаг, протейный синегнойный; имеются также комбинированные препараты. Применяют фаги при кишечных инфекциях, стрептококковой ангине, стафилококковой инфекции, ожогах, травмах, осложненных гнойным воспалением. Эффективным является лечение фагами в сочетании с антибиотиками.

3. Генетические исследования. Бактериофаги – удобная модель для расшифровки генетического кода, изучения тонкой структуры гена, молекулярных механизмов мутагенеза, влияния ионизирующего излучения и других факторов на наследственные структуры организма. Система фаг – бактериальная клетка является идеальным объектом для изучения взаимоотношений вируса и клетки, в частности процессов онкогенеза.

Раздел 7. Классификация и номенклатура вирусов. Основные таксономические группы вирусов, патогенных для человека и животных.

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ВИРУСОВ

Первые пытки классифицировать вирусы относятся к 40-м гг. XX века и, поскольку вирусология считалась частью микробиологии, то и классификация вирусов осуществлялась по критериям, разработанным для бактерий. Вследствие этого, в начале 50-х годов XX века было создано множество схем классификации, которые, однако, часто противоречили друг-другу, вплоть до взаимоисключения. В целях исправления создавшейся ситуации на Международном микробиологическом конгрессе в Москве (1966 г.) было принято решение об учреждении Международного комитета по номенклатуре вирусов (МКНВ). Позднее, в 1973 году, данный комитет был переименован в Международный комитет по таксономии вирусов (МКТВ) - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Каждые пять лет номенклатура вирусов обновляется с учетом открытия или новых свойств уже известных, либо открытия новых вирусов. Современная классификация вирусов включает 4 иерархических уровня: порядок, семейство (иногда подсемейство), род, вид, которые обозначаются соответствующими

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

окончаниями: -virales, -viridae, -virinae, -virus. В основу современной классификации вирусов положены следующие критерии:

1. тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), ее структура;
2. наличие липопротеидной оболочки;
3. стратегия вирусного генома;
4. размер и морфология вириона, тип симметрии, число капсомеров;
5. феномены генетических взаимодействий;
6. круг восприимчивых хозяев;
7. патогенность;
8. географическое распространение;
9. антигенные свойства.

Современная система классификации вирусов представляет собой объединение классификации ICTV и классификации по Балтимору, которая была разработана и предложена в 1971 г. Д. Балтимором.

Основой классификации вирусов по Балтимору является механизм образования мРНК. Каждое семейство вирусов обладает собственным механизмом осуществления данного процесса. Согласно имеющимся данным, вирусные геномы могут быть представлены одноцепочеными, двуцепочечными нитями нуклеиновых кислот, ДНК или РНК, использующими либо не использующими обратную транскриптазу. Помимо этого, вирусы, обладающие одноцепочечной РНК, могут иметь положительную или отрицательную цепь в составе своего генома.

На основании вышеизложенного Д. Балтимор выделил семь основных групп:

Группа I – вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК и не имеющие РНК-стадии (герпесвирусы, поксвирусы, паповавирусы).

Группа II – вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу ДНК (парвовирусы).

Группа III – вирусы, содержащие двуцепочечную РНК (ротавирусы).

Группа IV – вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности (пикорнавирусы, флавивирусы).

Группа V – вирусы, содержащие одноцепочечную молекулу РНК негативной или двойной полярности (ортомиксовирусы, филовирусы).

Группа VI – вирусы, содержащие одноцепочечную положительную молекулу РНК и имеющие в своем жизненном цикле стадию синтеза ДНК на матрице РНК (ретровирусы).

Группа VII – вирусы, содержащие двуцепочечную ДНК и имеющие в своём жизненном цикле стадию синтеза ДНК на матрице РНК (вирус гепатита В).

Дальнейшее деление производится на основе признаков, предложенных и используемых в классификации ICTV.

При этом необходимо учитывать тот факт, что на данный момент изучена лишь небольшая часть всего разнообразия вирусов. Существуют

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

виды вирусов, которые не могут быть точно отнесены к тому или иному семейству. Особенно это относится к вирусам растений. Все это говорит о том, что таксономия вирусов на данном этапе несовершенна и находится в стадии развития.

ОСНОВНЫЕ СИСТЕМАТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ ВИРУСОВ, ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Основные систематические группы вирусов, патогенных для человека и животных, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Основные систематические группы вирусов, патогенных для человека и животных

Семейство	Род	Представитель
Poxviridae	*Orthopoxvirus*	вирус оспы животных
	Avipoxvirus	вирус оспы птиц
	Leporipoxvirus	вирус фибромы зайцев, кроликов
	Entomopoxvirus	вирус, поражающий насекомых
Asfaviridae	*Asfavirus*	вирус африканской чумы свиней
Iridoviridae	*Ranavirus*	вирусы, поражающие морских и пресноводных рыб
	Lymphocystivirus	вирус, поражающий камбалу
Herpesviridae	*Simplexvirus*	герпесвирусы человека и животных
	Varicellovirus	вирус ветряной оспы
	Cytomegalovirus	цитомегаловирус человека и животных
Adenoviridae	*Mastadenovirus*	вирусы, вызывающие ОРВИ
	Aviadenovirus	аденовирусы птиц
Papillomaviridae	*Papillomavirus*	папилломы человека и животных
Filoviridae	*Ebola-like viruses*	вирус Эбола
	Marburg-like viruses	вирус Марбург
Paramixoviridae	*Respirovirus*	вирус парагриппа
	Rubulavirus	вирус свинки
	Morbillivirus	вирус чумы животных, вирус кори
	Pneumovirus	респираторно-синцитиальный вирус

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Retroviridae	*Lentivirus*	вирусы иммунодефицитов животных и человека
Flaviviridae	*Flavivirus*	вирус клещевого энцефалита

Раздел 8. Вирусные инфекции: классификация, патогенез.

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

В связи с тем, что вирусы являются внутриклеточными паразитами, в основе их взаимодействия с организмом лежит инфекционный процесс на уровне клетки, который реализуется путем взаимодействия вирусного и клеточного геномов. Поэтому возможно классифицировать инфекции как на клеточном уровне, так и на уровне организма.

Если вирусный геном реплицируется независимо от клеточного генома, такая инфекция называется автономной. Автономная форма инфекции характерна для большинства вирусов животных.

Если вирусный геном включается в состав клеточного генома (интеграция вирусного и клеточного геномов), такая инфекция называется интеграционной. При этой форме инфекции вирусный геном реплицируется и функционирует как составная часть клеточного генома.

Вирусная инфекция может быть продуктивной и абортивной. Продуктивная инфекция завершается образованием инфекционного потомства. Абортивной называется инфекция, которая не завершается образованием инфекционных вирусных частиц, или они образуются в гораздо меньшем количестве. Абортивная инфекция может возникнуть при заражении чувствительных клеток дефектными вирусами, заражении чувствительных клеток в неразрешающих условиях, заражении нечувствительных клеток стандартным вирусом. Дефектным называется такой вирус, который не способен проявить все генетические функции, необходимые для образования инфекционного потомства. Неразрешающие условия могут возникать как в организме (повышение температуры, изменение pH и т.д.), так и в эксперименте (изменение температуры инкубации, состава питательной среды и т.д.). Чувствительность клеток к вирусам определяется наличием на клеточной поверхности специфических рецепторов, обуславливающих адсорбцию и проникновение вируса в клетку.

Продуктивная и абортивная инфекция могут протекать в виде острой и хронической инфекции.

Острой называется такая форма инфекции, при которой после образования вирусного потомства клетка либо погибает, либо выздоравливает и не содержит вирусных компонентов. Хроническая инфекция – форма инфекции, при которой клетка продолжает продуцировать вирусные ча-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

стицы или вирусные компоненты в течение длительного времени и передает эту способность дочерним клеткам.

Острая инфекция может быть цитолитической и нецитолитической. Инфекция, завершающаяся гибелью (лизисом) клетки, называется цитолитической. Инфекция, при которой клетка не подвергается лизису, функционирует в течение некоторого периода времени и продуцирует вирусные частицы, называется цитолитической.

Патологические изменения зараженных вирусами клеток обусловлены специфическими и неспецифическими процессами. К неспецифическим процессам относятся изменение проницаемости цитоплазматической мембраны, маргинация хроматина, хромосомные аберрации, пикноз ядер, вакуолизация цитоплазмы. Специфическими процессами являются вирусные включения и образование симпластов.

Вирусные включения, выявляющиеся при окрашивании зараженных клеток, являются специфическими морфологическими признаками вирусной инфекции, часто имеющими диагностическое происхождение. Вирусные включения выявляются в ядре или цитоплазме зараженной клетки. В зависимости от прокрашивания разными красителями включения бывают базофильными и ацидофильными (эозинофильными). Включения при разных вирусных инфекциях различаются по величине, форме, численности.

Некоторые вирусы вызывают характерный цитопатический эффект, проявляющийся в слиянии клеток и образовании многоядерных клеток, называемых симпластами.

В основу классификации вирусных инфекций на уровне организма положены следующие факторы: генерализация вируса, продолжительность инфекции, проявление клинических симптомов, выделение вируса в окружающую среду.

Очаговые инфекции возникают в том случае, когда действие вируса проявляется у входных ворот инфекции в связи с его локальной репродукцией. При генерализованных инфекциях после ограниченного периода репродукции вируса в первичных очагах происходит генерализация инфекции, и вирус достигает чувствительных тканей, формируя вторичные очаги инфекции.

Вирусные инфекции на уровне организма могут быть острыми и персистентными. Острая инфекция длится относительно непродолжительный период времени и протекает с выделением вирусов в окружающую среду. Окончание инфекции сопровождается гибелью вирусов. Острая инфекция может завершиться выздоровлением или смертью макроорганизма.

При продолжительном взаимодействии вируса с организмом возникает персистентная форма инфекции. Один и тот же вирус может вызвать как острую, так и персистентную инфекцию в зависимости от состояния иммунной системы организма. Персистентные инфекции могут быть ла-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

тентными, хроническими и медленными в зависимости от выделения вирусов в среду и проявления симптомов заболевания.

Латентные инфекции протекают бессимптомно и могут сопровождаться либо нормальной репродукцией вируса во внешне здоровом организме и выделением его во внешнюю среду, либо вирусоносительством, при котором нарушен нормальный цикл вирусной репродукции, и вирус длительно персистирует в организме.

Хронические вирусные инфекции характеризуются длительно текущим патологическим процессом, периодическими состояниями выздоровления и рецидивов.

Медленные инфекции характеризуются продолжительным инкубационным периодом, длительным прогрессирующим течением болезни и заканчиваются тяжелыми расстройствами или, чаще, смертью. Типичным примером медленных инфекций является СПИД. В основе развития медленных инфекций лежат нарушения генетических, иммунологических и физиологических механизмов, которые обеспечивают длительную персистенцию возбудителя в организме.

Известны несколько механизмов, которые обусловливают длительное переживание вируса в организме:

1. вирус находится в дефектном состоянии, он неспособен размножаться и индуцировать эффективный иммунный ответ.
2. вирус находится в клетке в виде свободной геномной нуклеиновой кислоты, недоступной действию антител;
3. геном вируса интегрирован в хромосому клетки-мишени.

ПАТОГЕНЕЗ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Патогенез вирусных инфекций – совокупность процессов, вызывающих заболевание и определяющих его развитие и исход. Патогенез определяется следующими факторами:

1. тропизм вируса.
2. скорость репродукции вируса и количество инфекционных частиц в потомстве.
3. реакция клетки на инфекцию.
4. реакция организма на вызванные инфекцией изменения клеток и тканей.

Тропизм вируса к определенным клеткам и органам характерен для большинства вирусных инфекций. В основе тропизма лежит чувствительность к вирусу определенных клеток, тканей и органов макроорганизма.

Распространение вирусов в организме возможно по лимфатической системе (лимфатический путь), кровеносной системе (гематогенный путь) и нервной системе (нейрогенный путь.) Лимфатические сосуды являются одним из основных путей, по которым вирус распространяется от места

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

первоначальной локализации. Гематогенный путь распространения вирусов может быть ассоциирован с клеточными элементами (макрофаги, эритроциты, лейкоциты), либо вирусы переносятся в свободном виде с плазмой крови. Нейрогенный путь характеризуется распространением вирусов вдоль периферических нервов.

Механизм передачи вируса в цепи чувствительных хозяев – способ перемещения вируса из зараженного организма в восприимчивый. Механизм передачи включает последовательную смену трех стадий: выведение возбудителя из организма в окружающую среду, пребывание возбудителя в абиотических или биотических объектах окружающей среды, внедрение возбудителя в восприимчивый организм. В естественных условиях существует четыре основных механизма передачи возбудителя инфекции между особями одного поколения (горизонтальная передача): фекально-оральный, воздушно-капельный, трансмиссивный и контактный. Помимо перечисленных существует пятый путь (вертикальная передача), который обеспечивает переход вируса от одного поколения к другому (от матери к плоду).

Факторы передачи вируса – элементы окружающей среды, обеспечивающие передачу возбудителя инфекции от источника к восприимчивому хозяину. Основными факторами передачи являются воздух, вода, пищевые продукты, предметы обихода, кровососущие членистоногие.

Путь передачи вируса – совокупность факторов, обеспечивающих циркуляцию вируса между зараженными и восприимчивыми организмами. Различают пищевой, водный, бытовой, воздушно-капельный, трансмиссивный, бытовой пути передачи.

Раздел 9. Вирусы – возбудители инфекционных заболеваний человека.

ВОЗБУДИТЕЛИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОРЗ)

По частоте эти заболевания занимают первое место. Против вирусов, являющихся их возбудителями, отсутствуют эффективные вакцины, а воздушно-капельный путь передачи обуславливает быстрое распространение вируса в окружающей среде. Клетки слизистой оболочки верхних дыхательных путей и глаз несут большое количество маркеров, с которыми специфически взаимодействуют рецепторы вирусов

Вирусы гриппа

Семейство: Orthomyxoviridae

Род: *Influenzavirus* A, B; *Influenzavirus* C.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Вирус типа А открыли В. Смит, С. Эндрюс и П. Лейдлоу в 1933 г., вирус типа В выделили Т. Фрэнсис, Р. Меджилл в 1940 г., вирус типа С – Р. Тэйлор в 1949 г.

Вирус типа А вызывает грипп у человека, млекопитающих и птиц, а вирусы В и С – только у человека. Наибольшую роль в эпидемиологии вызывает вирус типа А.

Вирион имеет сферическую форму и диаметр 80-120 нм, молекулярная масса 250 МДа. Геном представлен однонитевой фрагментированной негативной РНК. Нуклеокапсид со спиральной симметрией. Суперкапсид содержит два гликопротеида – гемагглютинин и нейраминидазу, которые выступают над мембраной в виде шипов. Основными функциями гемагглютинина являются:

1. распознавание клеточного рецептора – мукопептида, имеющего N-ацетилнейраминовую кислоту;
2. обеспечение слияния мембраны вириона с мембраной клетки;
3. формирование протективных свойств.

К функциям нейраминидазы относятся:

1. обеспечение диссеминации вирионов путем отщепления нейраминовой кислоты от вновь синтезированных вирионов и мембраны клетки;
2. определение эпидемических свойств вируса.

Обнаружено 10 различных вариантов нейраминидазы. Источником инфекции является только человека, больной или носитель. Заражение происходит воздушно-капельным путем. Инкубационный период очень короткий – 1–2 суток. Вирус размножается в эпителиальных клетках слизистой оболочки дыхательных путей. Продукты распада поврежденных клеток попадают в кровь, вызывают сильную интоксикацию и повышение температуры. Вирус оказывает угнетающее действие на кроветворение и иммунную систему, что может привести к вторичным вирусным и бактериальным заболеваниям. Основным регулятором эпидемий гриппа является иммунитет. По мере нарастания иммунной прослойки эпидемия идет на убыль. Но при этом происходит отбор штаммов вируса с измененной антигенной структурой, которые продолжают вызывать вспышки.

Высокую изменчивость вируса гриппа можно объяснить следующими факторами. Во-первых, возникновением точечных мутаций, которым наиболее подвержены гены гемагглютинина и нейроминидазы. Во-вторых, реассоциаций генов между вирусами человека и птиц, млекопитающих, чему способствует сегментарная структура вирусного генома. Антигенный дрейф позволяет вирусу преодолевать существующий у людей иммунитет.Для лабораторной диагностики в качестве материала используют отделяемое носоглотки и кровь. Применяют вирусологические, серологические и генетические методы. Для специфической профилактики используют несколько типов вакцин: живую аттенуированную (из вирусов, которые спонтанно или в результате селекции утратили вирулентность, но сохра-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

нили иммуногенность), убитую цельновирионную, субвирионную, субъединичную.

Вирусы парагриппа.

Семейство: Paramyxoviridae

Род: *Paramyxovirus*

Первые изоляты вирусов выделены У. Чэноком в 1957 г.

Вирионы имеют сферическую форму, диаметр 150 – 200 нм. Геном представлен однонитевой нефрагментированной РНК. Нуклеокапсид имеет спиральную симметрию и окружен оболочкой из матриксного белка М. Вирион покрыт суперкапсидом, состоящим из липидного слоя и гликозилированных белков, обладающих гемагглютинирующей, нейроминидазной, гемолитической и симпластообразующей активностью. Являются весьма распространенными возбудителями ОРЗ. Часто поражают клетки гортани. Особенно тяжело заболевания протекают у детей. Для выявления, как правило, применяют иммунологические методы.

Респираторные аденовирусы.

Семейство: Adenoviridae

Род: *Mastadenovirus*

Впервые выделены У. Роу в 1953 г. из тканей миндалин и аденоидов. Лишены суперкапсида. Вирион имеет форму икосаэдра диаметром 70 – 90 нм. Каждый из вершинных капсомеров несет нитчатые выступы (фибры), заканчивающиеся головкой. Наследственная информация представлена двунитевой ДНК. Источником инфекции является только больной человек. Заражение происходит воздушно-капельным или контактно-бытовым путем. В зависимости от серовариантa вируса, заболевание может затрагивать верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт. Аденовирусы вызывают спорадические заболевания и локальные эпидемические вспышки.

Инкубационный период длится 6 - 9 дней. Заболевания чаще всего протекают в виде тонзиллита, фарингита, бронхита, атипичной пневмонии, фаринго-конъюнктивальной лихорадки. Вместе с тем, вирус способен вызывать латентную (бессимптомную) или хроническую инфекцию с длительным персистированием в тканях миндалин и аденоидов.

ВОЗБУДИТЕЛИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Острые кишечные заболевания (ОКЗ) по частоте занимают второе место после острых респираторных заболеваний. Причин повсеместного распространения ОКЗ много, но главными являются три из них.

1. Низкий уровень жизни населения, плохие санитарно-гигиенические условия.

2. Отсутствие эффективных вакцин против многих кишечных заболеваний.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

3. Большое количество разнообразных возбудителей ОКЗ.

Вирус полиомиелита.

Семейство: Picornaviridae

Род: *Enterovirus*

Вирусная этиология полиомиелита была установлена К. Ландштайнером и Г. Поппером в 1909 г.

Вирус имеет сферическую форму, молекулярная масса 8–9 МДа. Геном представлен однонитевой нефрагментированной РНК. Белки оболочки играют роль в распознавании рецептора клетки-хозяина, в прикреплении к ней вириона и высвобождении вирусной РНК внутри клетки. Гемагглютинирующими свойствами вирион не обладает. Способность вируса полиомиелита вызывать паралич, по-видимому, связана с одним из белков оболочки. Источником инфекции является только человек. Основной способ заражения – фекально-оральный. Входными воротами для вируса являются слизистые глотки, желудка, кишечника. В них происходит первичное размножение вируса. Затем он проникает в лимфатические узлы и кровь. Эти две стадии протекают бессимптомно. Вирусы могут проникать в центральную нервную систему. Вызываемая жизнедеятельностью вируса гибель двигательных нейронов приводит к развитию параличей скелетных мышц. Больной либо умирает, либо остается инвалидом. После перенесенного заболевания (в том числе, и в скрытой форме) остается прочный пожизненный иммунитет. Специфическая терапия против вируса отсутствует. Больным необходимо поддерживать ортопедический режим и заниматься физическими упражнениями под надзором врачей. В середине XX века были созданы весьма эффективные вакцины против полиомиелита, обеспечивающие создание коллективного иммунитета.

Ротавирусы.

Семейство: Rotaviridae

Род: *Rotavirus*

Впервые выделены Р. Бишопом в 1973 г.

Вирион имеет сферическую форму. Геном представлен двунитевой фрагментированной РНК и окружен капсидом, состоящим из двух слоев. В сердцевине располагается также вирусная РНК-полимераза. Внешний белок капсида обеспечивает проникновение вируса в клетку и обладает гемагглютинирующим свойством. Источником заражения является человек. Болеют главным образом дети до четырех лет. Вирус размножается в эпителиальных клетках двенадцатиперстной кишки. Инкубационный период составляет от 1 до 7 дней. Основным ранним симптомом является рвота, отмечается также небольшое повышение температуры. Лечение преследует три главные цели: прекращение дегидратации, поддержание нормального водно-солевого обмена, обеспечение нормального питания. Для обнаружения вируса используют иммунологические (РПГА, ИФА) и генетические (РНК-зонды) методы. Вакцин против ротавирусной инфекции нет.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Вирусные гепатиты.

Группа заболеваний с общими клиническими синдромами. Представляют серьезнейшую глобальную проблему. Впервые инфекционный гепатит был выделен в самостоятельную нозологическую форму в 1888 г. русским врачом П.С. Боткиным.

Вирус гепатита А.

Семейство: Picornaviridae

Род: *Hepatovirus*

Вирус имеет сферическую форму (икосаэдр), диаметр – 27 нм. Геном представлен однонитевой позитивной РНК. Суперкапсид отсутствует. Источником инфекции является только человек. Способ заражения – фекально-оральный (главным образом, водный), а также бытовой и пищевой пути. К особой группе риска относятся дети до 14 лет. Болезнь имеет осенне-зимнюю сезонность. Инкубационный период варьирует от 15 до 50 дней. Вирус размножается в региональных лимфатических узлах, проникает в кровь, а затем в клетки печени. Размножение вируса в гепатоцитах приводит к снижению дезинтоксикационной и барьерной функций печени. Наиболее приемлемым способом диагностики вируса гепатита является иммуноферментный анализ. Для профилактики заболевания разработано несколько типов вакцин.

Вирус гепатита В.

Семейство:Hepadnaviridae

Род: *Orthohepadnavirus*

Вирион имеет сферическую форму, диаметр – 42 нм. Суперкапсид состоит из трех белков. Геном представлен двунитевой кольцевой ДНК. В составе вируса гепатита В нет онкогена, однако установлено, что, внедряясь в клеточный геном, вирусная ДНК может индуцировать различные генетические перестройки, которые и могут стать причиной развития рака печени. Источником заражения является только человек. Заражение происходит парентеральным, половым и вертикальным (от матери к плоду) путем. Гематогенным путем вирус заносится в печень. В патогенезе важную роль играют аутоиммунные реакции, спровоцированные модификациями клеточной мембраны вирусными белками. Инкубационный период составляет в среднем 60–90 дней. Болезнь может протекать в латентной, типичной желтушной, злокачественной формах. В случае выздоровления формируется стойкий иммунитет. Но заболевание может перейти и в хроническую форму, человек становится носителем. Основным методом диагностики является использование реакции обратной пассивной гемагглютинации. Также разработан метод ДНК-зондов. Для профилактики заболевания используют два типа вакцин:

1. Вакцина, полученная из плазмы вирусоносителя.
2. Генно-инженерная вакцина.

Вирус гепатита С.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Семейство: Flaviviridae

Род: *Hepacivirus*

Вирион имеет сферическую форму, диаметр – 60 нм. Геном представлен однонитевой нефрагментированной РНК. Имеется суперкапсид.

Источником инфекции является человек. Пути заражения такие же, как для вируса гепатита В, но клиническое течение легче. До 70 % заболеваний протекает в скрытой форме. Помимо гепатоцитов вирус может поражать нервные клетки. Наиболее эффективный способ диагностики – полимеразно-цепная реакция. Основное патогенетическое средство лечения – интерферон.

Герпесвирусы.

Вирус простого герпеса.

Семейство: Herpesviridae

Род: *Simplexvirus*

Вирион сферический, диаметром 150–210 нм. Геном представлен двунитевой линейной ДНК, состоящей из двух фрагментов. Нуклеиновая кислота покрыта белком. Имеется капсид и суперкапсид. Эпидемиология различна для вирусов типа 1 и 2. Имеются данные, что до 70–90 % людей инфицированы вирусом герпеса 1 типа. Он передается прямым контактом через слюну или посуду. Заболевание протекает в форме везикулярного или афтозного стоматита. Вирус простого герпеса типа 2 передается половым путем или во время родов от больной матери ребенку. Распространяется как типичная венерическая болезнь. Для диагностики могут быть использованы вирусоскопический, вирусологический и серологический методы. В качестве средств специфического лечения используют химиопрепараты – модифицированные нуклеозиды, подавляющие репликацию вируса. В случае острого заболевания эффективны индукторы интерферона.

ВИРУСЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Клещевой энцефалит

Семейство: Flaviviridae

Род: *Flavivirus*

Возбудитель выделили Л.А. Зильбер, Е.Н. Левкович, М.П. Чумаков в 1937 г.

Вирион сферической формы, диаметр 25–45 нм. Геном представлен одноцепочечной позитивной линейной РНК. Нуклеиновая кислота окружена белковым капсидом. Имеется липидный суперкапсид, пронизанный гликозилированными белками, образующими шипы, которые, как правило, обладают гемагглютинирующим свойством. В соответствии с видом переносчика различают два типа вируса клещевого энцефалита: персулькатный (переносчик *Ixodes persulcatus*) и рицинусный (переносчик *Ixodes ricinus*). Заражение происходит трансмиссивным путем. Инкубационный период от

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

1 до 30 дней. Начало заболевания острое: озноб, головная боль, повышение температуры, тошнота, боль в мышцах.

Лабораторная диагностика осуществляется в основном вируслогическими и серологическими методами. Лечение симптоматическое. Для профилактики заболевания используют убитую культуральную вакцину.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.

Семейство: Bunyaviridae

Род: *Hantavirus*

Вирион сферической формы, диаметр около 50 нм. Геном представлен однонитевой фрагментированной негативной РНК. Имеется капсид и суперкапсид.

Главными носителями являются грызуны – мышь полевая и восточноазиатская, полевки, серые крысы. Инфицированные грызуны выделяют вирус со слюной, мочой и экскрементами. Заражение человека происходит через воздух. Вирус, проникнув в организм, циркулирует в крови в течение 5–7 дней и, обладая выраженным вазотропным действием, поражает стенки капилляров и мелких вен. При этом наиболее выраженные изменения наблюдаются в почечных сосудах. Инкубационный период 11–23 дня. Начало болезни острое: озноб, повышение температуры, боли в мышцах, светобоязнь. С 3–5 дня болезни на коже появляется геморрагическая сыпь. Сильнее всего поражаются почки, их функция восстанавливается только через 2–3 месяца после выздоровления. Иммунитет после перенесенного заболевания стойкий, длительный. В лабораторной диагностике используют иммунологические методы. Для лечения применяют интерферон; при острой почечной недостаточности необходим гемодиализ.

ВИРУС ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

Семейство: Retroviridae

Род: *Lentivirus*

Впервые выделен французским вирусологом Л. Монтанье в 1983 г. под названием LAV (Lymphoadenopathy associated virus) и американским вирусологом Р. Гэлло в 1984 г. под названием Т-лимфотропный вирус человека. После установления идентичности этих двух форм во избежание путаницы вирусу было присвоено название вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Вирион шаровидной формы, диаметр 110 нм. Геном представлен однонитевой нефрагментированной позитивной РНК, имеющей вид двух идентичных молекул, связанных 5’-концами. Оболочка вируса имеет форму многогранника и несет 72 молекулы гликозилированного протеина в виде шипов. Вместе с двойным липидным слоем эти белки образуют суперкапсид. В центре вириона находится конусообразный капсид, помимо структурного белка содержащий ферменты ревертазу (обратная тран-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

скриптаза; ДНК-зависимая ДНК-полимераза; РНК-аза Н), протеазу и интегразу. Проникнув в организм, вирус с помощью поверхностного белка распознает клетки, содержащие специфический маркер CD4. Этот рецептор имеют Т-хелперные клетки и в меньшей степени макрофаги. Попадая в клетку, нуклеиновая кислота вируса перестраивается из РНК-формы в ДНК-форму и внедряется в геном клетки-хозяина. Провирус находится в неактивном состоянии до тех пор, пока Т-лимфоцит не будет активирован. С момента проникновения вируса в клетки начинается период ВИЧ-инфекции – вирусоносительство, которое может продолжаться до 10 лет. С момента активации начинается болезнь – СПИД. Вирус крайне изменчив. Даже из организма одного больного могут быть выделены штаммы вируса, существенно различающиеся по антигенным свойствам. Известны две крупные формы ВИЧ-1: O (Outlier) и M (Major), последнюю подразделяют на 10 субтипов (A – J). Форма ВИЧ-2 характерна для Западной Африки. Источником инфекции является только человек – больной или вирусоноситель. Вирус содержится в крови, сперме, цервикальной жидкости, у кормящих матерей – в грудном молоке. Заражение происходит половым путем, через кровь и ее препараты, от матери к ребенку. Случаи заражения вирусом через пищевые продукты, напитки и через укусы насекомых не известны.

Особенности патогенеза ВИЧ-инфекции:

1. Вирус обладает очень высокой скоростью размножения.
2. Вирус индуцирует образование обширных синцитиальных структур за счет слияния инфицированных и неинфицированных Т-хелперов.
3. Молекулы поверхностного белка свободно циркулируют в крови, связываются со здоровыми Т-хелперами, изменяя их антигенную структуру, в результате чего они распознаются и уничтожаются Т-киллерами как чужеродные.
4. При размножении вируса Т-хелперы погибают в результате апоптоза, их титр в крови резко снижается.
5. Снижается экспрессия мембранных рецепторов у В-клеток, нарушается синтез различных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6).
6. Нарушается функция Т-киллеров.
7. Происходит подавление системы комплемента и макрофагов.
8. Из-за структурного и антигенного сходства поверхностного белка вируса с рецепторами некоторых эпителиальных клеток макроорганизма происходит синтез аутоиммунных антител с широким спектром действия.
9. Вирус обладает нейротропностью и поражает клетки нервной системы.
10. В результате нарушения работы иммунной системы возникает риск оппортунистических инфекций, опухлевых болезней и поражения ЦНС.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Основным способом диагностики вирусоносительства и ВИЧ-инфекции является иммуноферментный метод. Однако в связи с тем, что поверхностный белок вируса имеет сродство с рецепторами некоторых клеток человека, в организме могут появляться антитела, родственные антителам против поверхностного белка. В этом случае могут быть ложнопозитивные результаты ИФА. Поэтому все положительно реагирующие сыворотки подвергаются дополнительному анализу с помощью иммуноблотинга.

Для лечения ВИЧ-инфекции необходимо найти или синтезировать препараты, эффективно подавляющее активность обратной транскриптазы или вирусной протеазы. Для специфической профилактики необходимо создание вакцины, которая бы обеспечивала формирование эффективного клеточно-опосредованного иммунитета на основе вирусспецифических ЦТЛ. Вируснейтрализующие антитела в данном случае не действенны.

Раздел 10. Современные методы вирусологических исследований и диагностики вирусных инфекций.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Первым для изучения свойств вируса бешенства стал использовать лабораторных животных Л. Пастер.

Использование лабораторных животных позволяет выделять вирусы, по симптомам определять характер вирусной инфекции, поддерживать лабораторные штаммы вирусов, сохранять антигенные свойства и активность вирусов, получать диагностические и лечебно-профилактические вирусные препараты.

В качестве лабораторных животных чаще всего используются белые мыши, хомяки, морские свинки, кролики, реже обезьяны; из птиц – куры, гуси, утки.

К лабораторным животным предъявляют весьма строгие требования. Животные должны быть в достаточной степени восприимчивы к инфекции данным вирусом и не нести в себе латентной инфекции и каких-либо паразитов. В эксперимент берут животных одного пола, возраста, массы, лучше из одного питомника или партии. После заражения особей вируссодержащим материалом важно своевременно и правильно взять материал для дальнейшего исследования. Результаты выделения вируса считают положительными, если у животного после соответствующего инкубационного периода развиваются симптомы инфекции.

В последние годы чаще применяют новорожденных животных (более чувствительных к вирусам), «стерильных животных» и животных чистых линий с известной наследственностью (инбредные, или линейные, животные).

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Использовать для культивирования вирусов куриные эмбрионы, в клетках которых успешно размножаются многие вирусы, было предложено Р. Гудпасчуром в 1932 г.

Метод культивирования вирусов в развивающихся эмбрионах имеет ряд преимуществ перед другими методами: плотная скорлупа довольно надежно защищает внутреннее содержимое от микроорганизмов; эмбрионы не имеют антител и восприимчивы ко многим группам вирусов; при заражении куриных эмбрионов получают большой выход вируссодержащего материала; данный метод прост и доступен любым вирусологическим лабораториям. Однако куриные эмбрионы не всегда свободны от латентных вирусных и бактериальных инфекций. Трудно также наблюдать за динамикой патологических изменений, происходящих в эмбрионе после его заражения вирусом. При вскрытии зараженных эмбрионов часто не обнаруживают видимых изменений и выявляют вирус с помощью реакций гемагглютинации. В зараженных эмбрионах невозможно проследить за нарастанием титра антител. Данный метод пригоден не для всех вирусов.

Для исследований используют эмбрионы 7–12-дневного возраста. При работе с вирусами могут быть использованы различные методы заражения эмбрионов, но наибольшее практическое применение получили следующие: нанесение вируса на хорион-аллантоисную оболочку, введение в аллантоисную, амниотическую полости и желточный мешок. Выбор метода зависти от биологических свойств изучаемого вируса.

Куриные эмбрионы заражают в боксе в строго асептических условиях, используя стерильные инструменты. Отверстие в скорлупе закрывают покровным стеклом и заливают парафином. На боковой поверхности зараженных яиц пишут дату заражения, название материала и его дозу. Срок и температурный режим инкубации зараженных яиц зависят от биологических свойств инокулированного вируса. Перед сбором материала эмбрионы охлаждают при 4°С в течение 18–20 ч для сужения сосудов. Исследуемые жидкости забирают асептически, проверяют на бактериологическую стерильность и хранят при 4°С в замороженном состоянии. Наличие вируса в полученных жидкостях определяют в реакции гемагглютинации.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Для количественного накопления вирусов наиболее удобную систему представляют культуры клеток. Первые попытки культивирования клеток животных вне организма относятся к концу прошлого столетия. Первые успешные опыты по культуре клеток осуществил в 1907 г. американский учёный Р. Гаррисон, поместив в каплю лимфы кусочек зачатка нерв-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ной системы зародыша лягушки. Клетки зачатка оставались живыми несколько недель, из них вырастали нервные волокна. Метод культур клеток был усовершенствован А. Каррелем, М. Берроузом и А.А. Максимовым, использовавшими в качестве среды плазму крови и вытяжку из тканей зародыша. Существенный сдвиг в развитии метода произошёл в связи с установлением возможности культивирования клеточной взвеси, получаемой из любой ткани под воздействием протеолитического фермента трипсина, растворяющего межклеточное вещество. Для таких клеточных культур используется синтетическая жидкая питательная среда, содержащая физиологический раствор, 12 аминокислот, витамины, глюкозу и, как правило, сыворотку крови; обязательно добавление к среде антибиотиков. Для культур клеток используются в зависимости от конкретных задач разнообразные сосуды: стекла с углублением, флаконы, пробирки, матрасы, большие сосуды типа ферментеров. В зависимости от степени приспособления к условиям существования вне организма клеточные культуры делят на 3 категории.

1. Первичные клеточные культуры – клеточные культуры, полученные непосредственно из тканей человека или животных в эмбриональном или постнатальном периоде. Срок жизни таких культур ограничен. Периодическое обновление среды может лишь несколько увеличить сроки жизни первичных клеточных культур, но не способно предотвратить их конечной деструкции и гибели. Известны такие первичные культуры, как культура клеток почки золотистого хомячка, культура клеток почки сибирского горного козерога, культура клеток почки зеленой мартышки.

2. Диплоидные (полуперевиваемые) клеточные культуры –это штаммы, получаемые в особых условиях из эмбриональных тканей человека и животных; их характерная черта – стабильность биологических свойств, в частности постоянство диплоидного набора хромосом; клетки сохраняются без изменения в течение 10–12 месяцев.

3. Перевиваемые клеточные культуры – это клетки, полностью адаптированные к существованию вне организма, характеризующиеся потенциальным бессмертием и размножающиеся неограниченно долгое время. Их получают из нормальных и раковых тканей. Получены и наиболее широко в вирусологической практике применяются следующие линии перевиваемых клеток: HeLa – получена из карциномы шейки матки; Hep-2 – из карциномы гортани; Детройт-6 – из метастаза рака легкого в костный мозг; RH – из опухоли почки человека.

В зависимости от техники культивирования различают несколько видов клеточных культур. Наибольшее распространение имеют однослойные, роллерные и суспензионные культуры клеток. Именно они составляют основу современной лабораторной и производственной вирусологической практики.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

До недавнего времени тканевые культуры применялись в вирусологии преимущественно в виде однослойных стационарных культур. Многолетний опыт показывает, что при использовании однослойных стационарных культур встречается ряд трудностей, связанных с огромными затратами рабочего времени и материалов. С этой точки зрения более выгодны роллерные культуры, которые экономичны, характеризуются оптимальным отношением полезной площади культивирования к объему питательной среды и открывают благоприятные возможности для накопления клеточной массы. Термин «роллерные культуры» обозначает метод культивирования, при котором клеточный монослой располагается по всей цилиндрической поверхности горизонтально вращающихся сосудов и периодически омывается питательной средой. Роллерный метод культивирования позволяет получить большие количества клеток.

В 1953 г. Р. Оуенс с сотрудниками впервые показал способность клеток размножаться в жидкой среде в свободно суспендированном состоянии. Оказалось, что клетки перевиваемых линий, в отличие от остальных типов клеточных культур, могут длительно культивироваться во взвешенном состоянии. Клетки в этих условиях размножаются, не прикрепляясь к стенкам сосуда, находясь в суспензионном состоянии, благодаря постоянному перемешиванию среды.

В любой клеточной культуре различают клеточную и жидкую фазы. Жидкая фаза обеспечивает жизнедеятельность клеток культуры и представляет собой питательные среды различного состава и свойств.

Все среды по своему назначению делятся на ростовые и поддерживающие. В составе ростовых сред должно содержаться больше питательных веществ, чтобы обеспечить активное размножение клеток. Поддерживающие среды фактически должны обеспечивать лишь переживание клеток в монослое.

Ростовые и поддерживающие среды многокомпонентны. В их состав могут входить как естественные продукты (амниотические жидкости, сыворотки животных), так и субстраты, полученные в результате частичной обработки естественных продуктов (эмбриональные экстракты, гидролизат лактальбумина, гемогидролизат, аминопептид и т. д.), а также синтетические химически чистые вещества (аминокислоты, витамины, соли). Неотъемлемым компонентом большинства ростовых сред является сыворотка животных, без наличия которой размножение клеток и формирование монослоя не происходит. Наибольшее применение находят синтетическая среда 199 и среда Игла.

Независимо от назначения все питательные среды для тканевых культур конструируются на основе какого-либо сбалансированного солевого раствора с достаточной буферной емкостью. Чаще всего ими являются растворы Хенкса и Эрла.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Индикатором наличия вируса в зараженных культурах клеток могут служить специфическая дегенерация клеток и внутриклеточные включения. Наличие вируса можно также обнаружить методом иммунофлюоресценции; в реакции гемадсорбции и гемагглютинации. Широкое распространение получил метод бляшек (негативных колоний), позволяющий производить количественное определение вирусов. О росте вирусов в культурах клеток можно судить с помощью индикатора, добавляемого к питательной среде. Если клетки активно осуществляют метаболизм, pH среды сдвигается в кислую сторону, цвет среды изменяется. В случае размножения вируса клетки погибают, pH среды мало меняется, и она сохраняет первоначальный цвет.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакция агглютинации – склеивание корпускулярных антигенов антителами в присутствии электролитов, в результате чего выпадает осадок. В вирусологических исследованиях наиболее часто используют реакцию непрямой гемагглютинации. Гемагглютинация – это склеивание эритроцитов, приводящее к образованию конгломератов, видимых невооруженным глазом. Особенностью метода является использование эритроцитов животных (барана, кролика) в качестве носителей вирусной антигенной детерминанты (сенсибилизированные эритроциты). О качестве реакции судят по характеру осадка: наличие фестончатого осадка свидетельствует о положительной реакции, плотный осадок в виде пуговки – об отрицательной реакции.

Реакция преципитации – иммунологическая реакция, основанная на осаждении комплекса растворимого молекулярного антигена с антителом, в результате чего появляется помутнение (преципитат).

Реакция нейтрализации – иммунологическая реакция, основанная на способности антител специфически подавлять (нейтрализовать) биологическую активность вируса в различных тест-системах – организме животных, куриных эмбрионах, культуре клеток.

Иммуноферментный анализ (ИФА) – метод количественного определения антител и антигенов, в котором используются антитела, меченные ферментом, и, в результате ферментативной реакции изменяется цвет одного из компонентов. В качестве фермента используется пероксидаза хрена, β-галактозидаза или щелочная фосфатаза. При добавлении к ферменту его субстрата и хромогена, последний изменяет окраску. Интенсивность окраски хромогена прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. Изменение окраски определяют спектрофотометрически – по оптической плотности окрашенного раствора.

Реакция связывания комплемента – метод полуколичественного выявления антител или антигенов, основанный на отсутствии гемолиза за

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

счет связывания комплемента комплексом антиген-антитело. К иммунному комплексу антиген-антитело, содержащемуся в исследуемом материале, присоединяется комплемент. Если комплемент связан, при добавлении гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка) гемолиз не наблюдается (реакция положительная). Если взаимодействия антиген-антитело не произошло, и комплемент не связан, то при добавлении гемолитической системы комплемент взаимодействует с антителами гемолитической сыворотки и провоцирует гемолиз (реакция отрицательная).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод молекулярной гибридизации основан на гибридизации вирусной ДНК или РНК с помощью известного зонда, меченного радиоактивным фосфором ^{32}P. Специфичность и чувствительность теста зависит от структуры используемого зонда, биологических особенностей вируса, условий транспортировки и хранения материала от больных. Метод может быть использован не только для выявления вирусных частиц в патологическом материале, но и для обнаружения и идентификации вирусов в объектах окружающей среды.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику вирусных заболеваний. Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от репликации ДНК в живых организмах, с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. Длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты: ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать; два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК; термостабильная ДНК-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК; дезоксинуклеозидтрифосфаты; ионы Mg^{2+}, необходимые для работы полимеразы; буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции. Процесс амплификации включает многократное повто-

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

рение определенных циклов. Каждый цикл состоит из следующих стадий: денатурация (разрыв двуцепочечной ДНК-матрицы с образованием одноцепочечных ДНК); отжиг (образование связи между праймерами и одноцепочечной матрицей); элонгация (достройка праймеров на матрице ДНК и образование двуцепочечных ДНК).

Биочипы – матричные миниатюризированные аналитические системы. Диагностический биочип представляет собой стеклянный слайд, на котором в правильном порядке иммобилизованы образцы ДНК, РНК или белков. Данные образцы способны специфически взаимодействовать с образцами, полученными из содержащего вирусные частицы клинического материала пациента. При этом меняются физические (например, оптические) параметры точек, способных к специфическому взаимодействию. Далее, на основании специфичности взаимодействия, делается заключение о наличии в образцах тех или иных вирусных агентов. Наиболее часто используемыми микрочипами являются ДНК-чипы. Длина используемых олигонуклеотидов составляет от десятков до сотен нуклеотидов. Число упорядоченных зондов на слайде может достигать сотен тысяч. Миниатюризация диагностических систем, переход в область нанотехнологий влечет за собой снижение себестоимости производства, большую степень автоматизации, лучшую воспроизводимость результатов, возможность разработки универсальных диагностикумов, позволяющих одновременно выявлять и типировать сотни вирусов в рамках одного эксперимента.

Раздел 11. Иммунная система и противовирусный иммунитет.

ИММУННАЯ СИСТЕМА

Иммунитет – способ защиты организма от всех чужеродных веществ как эндогенной, так и экзогенной природы. Биологический смысл подобной защиты заключается в обеспечении генетической целостности организма.

Механизмы иммунной защиты организма принято подразделять на факторы врожденного и приобретенного иммунитета. Факторы врожденного иммунитета присутствуют в организме еще до встречи с каким-либо болезнетворным микроорганизмом или чужеродной молекулой. К ним относятся физические и физиологические барьеры (кожа, слизистые оболочки и их секреты, температура тела и pH и т.п.), фагоцитирующие клетки крови и тканей (макрофаги и нейтрофилы), натуральные киллеры, белки системы комплемента, цитокины, интерфероны и др. За счет активации компонентов врожденного иммунитета в ответ на проникновение антигена развивается воспаление – сложная, комплексная реакция, направленная на ограничение очага поражения, уничтожение чужеродного агента и восстановление поврежденной ткани.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Более эффективным способом защиты внутренней среды организма от проникающих в нее чужеродных агентов (антигенов), является специфический иммунный ответ, в результате которого организм приобретает дополнительные защитные механизмы: специализированные клетки и продуцируемые ими молекулы. Защитное действие этих механизмов строго избирательно (специфично) в отношении конкретного антигена.

Антигены и антитела. Антиген – структурно чужеродное для данного организма вещество, способное вызвать иммунный ответ. Антигены имеют участки, состоящие из немногих аминокислот или углеводов, на которые формируется специфический иммунный ответ, – эпитопы или антигенные детерминанты. Основными свойствами антигенов являются:

1. Специфичность – отличие данного антигена от индивидуального антигенного состава реципиента.

2. Иммуногенность – способность инициировать иммунную систему к формированию эффекторов, нейтрализующих антигенную чужеродность.

Антитела – специфические белки иммуноглобулины, образующиеся в организме под воздействием антигенов, обладающие свойством специфически с ними связываться. Антитела продуцируются активированными В-лимфоцитами.

Мономеры антител состоят из двух тяжелых и двух легких белковых цепей, объединенных дисульфидными связям. По структуре тяжелых цепей выделяют 5 классов иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM), каждый из которых выполняет свою роль в иммунных реакциях.

Клетки иммунной системы. Клетки, принимающие участие в становлении и функционировании иммунной системы, можно разделить на две группы:

1. Основные клетки лимфоидного комплекса: Т-, В-лимфоциты и их субпопуляции;

2. Вспомогательные клетки иммунной системы: макрофаги, дендритные клетки, натуральные киллеры.

В-клетки осуществляют гуморальную форму иммунного ответа – синтезируют специфические антитела. Образуются в красном костном мозге, дифференцировку проходят, предположительно, там же или в лимфатических узлах кишечника, кожи, миндалинах. Одной из основных особенностей является наличие поверхностного рецептора, способного к специфическому распознаванию чужеродного антигена. После взаимодействия с антигеном дифференцировка В-клеток идет по двум направлениям – до активно продуцирующего антитела плазмоцита и формирования В-клеток памяти. К дополнительным функциям В-клеток относится презентация антигена для Т-хелперов.

Т-клетки – основные участники клеточной формы иммунного реагирования. Образуются в красном костном мозге, дифференцировку проходят в тимусе.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Основные субпопуляции Т-клеток:

1. Цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ, Т-киллеры) – эффекторные клетки. Вызывают гибель клеток-мишеней, несущих на поверхности чужеродный антиген.

2. Т-супрессоры – регуляторные клетки. Ингибируют активность других клеток иммунной системы.

3. Т-хелперы воспаления – регуляторные клетки. Активируют макрофаги, стимулируют образование ЦТЛ, участвуют в аллергических реакциях, стимулируют размножение и активность натуральных киллеров, поддерживают пролиферацию Т-супрессоров.

4. Собственно Т-хелперы – регуляторные клетки. Индуцируют пролиферацию В-клеток и выработку ими иммуноглобулинов, синтезируют интерлейкины-4, -5, -6, -10.

NK-клетки – нормальные киллеры, лимфоциты периферии. Не обладают структурами для специфического распознавания антигена. Способны убивать некоторые опухолевые, а так же инфицированные вирусами клетки. При активации выбрасывают перфорин, разрушающий мембрану модифицированной клетки.

Макрофаги – фагоцитирующие мононуклеары. Участвуют в неспецифическом иммунитете, удалении отживших и разрушенных клеток собственного организма, презентации антигена, продуцируют разнообразные цитокины.

Дендритные клетки расположены в тимусе, лимфатических узлах, тканях слизистых. Способны представлять антиген в иммуногенной форме и сохранять его для ускоренного развития вторичного иммунного ответа.

Главный комплекс гистосовместимости (МНС) – группа близкосцепленных генов шестой хромосомы, кодирующих иммунологически значимые молекулы трех классов. Продукты данных генов – лейкоцитарные антигены (human leukocyte antigens – HLA) – определяют биологическую индивидуальность каждого человека. Все гены комплекса наследуются по кодоминантному типу.

Продукты генов МНС I класса присутствуют на поверхности всех ядросодержащих клеток и определяют специфичность организма. Играют важную роль в гуморальной регуляции, вовлечены в процессы дифференцировки при эмбриональном развитии.

Белки МНС II класса присутствуют на поверхности В-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток. Обеспечивают взаимодействие между Т-лимфоцитами и макрофагами. Т-хелперы распознают чужеродный антиген только в комплексе с белками МНС II класса.

Продукты генов МНС III класса не участвуют в контроле иммунного ответа, основной их функцией является восстановление поврежденных белков в клетке.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Презентация антигена. Способностью представлять (презентировать) антигены Т-лимфоцитам обладают антигенпрезентирующие клетки (АПК): дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты. Представлению антигена предшествуют следующие стадии:

1. Захват поступившего в организм антигена.
2. Переработка (дезинтеграция) антигена.
3. Формирование комплексов накопившихся антигенов с собственными молекулами МНС.
4. Транспортировка образовавшихся комплексов на мембрану АПК.
5. Доставка образовавшихся комплексов во вторичные лимфоидные органы для представления Т-лимфоцитам.

ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ

Вирусы в течение эволюции адаптировались к использованию биосинтетического аппарата клетки хозяина и являются облигатными внутриклеточными паразитами. Все это определяет особенности противовирусного иммунитета.

Механизмы врожденного противовирусного иммунитета. К механизмам врожденного иммунитета относятся NK-клетки и интерфероны.

NK-клетки представляют собой крупные лимфоциты. Основной их функцией является цитолитическая, которая обеспечивается содержанием в гранулах этих клеток белка перфорина и сериновых эстераз. Нормальные киллеры являются продуцентами ряда цитокинов, а также интерферона γ. NK-клетки несут на поверхности особые рецепторы, способные связываться с белками МНС I класса собственных клеток организма. Эти рецепторы не активируют, а ингибируют киллерную функцию. Если при контакте с какой-либо клеткой эти рецепторы «не находят» достаточного количества белков МНС I класса, то ингибирующий сигнал также оказывается недостаточным, и NK развивает в отношении этой клетки цитотоксическую атаку и убивает ее.

Интерфероны – основные факторы врожденной защиты от вирусов. Считается, что основным их источником являются лимфоидные дендритные клетки. Индуктором синтеза интерферонов служат молекулы двуспиральной РНК. Это может быть геномная РНК вирусов или промежуточный продукт транскрипции у ДНК-содержащих вирусов. Интерфероны индуцируют в клетке биосинтез необычных ферментов, нарушающих репликативный цикл вируса, а также приводят к активации NK-клеток.

Механизмы приобретенного противовирусного иммунитета.

Для успешного уничтожения и запоминания вирусных антигенов необходимо их представление эффекторным и регуляторным Т-лимфоцитам. Основную роль в презентации вирусных антигенов играют дендритные клетки. Этот тип АПК обильно представлен в лимфоидной

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ткани и обладает выраженной и постоянной экспрессией молекул МНС I и II классов. Они не обладают способностью к фагоцитозу, но захватывают вирусные частицы посредством пиноцитоза. У них отсутствует выборочность при столкновении с вирусами, они поглощают самые разнообразные вирусные частицы. В результате происходит быстрое формирование иммуногенных комплексов вирусных пептидов с соответствующими белками МНС (рис. 6), создаются условия для включения в иммунный ответ Т-киллеров и Т-хелперов.

При вирусной инфекции основными эффекторными клетками являются цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры, ЦТЛ). Этапы цитолитического действия ЦТЛ включают: распознавание антигена предшественниками, их пролиферацию и дифференцировку до зрелых эффекторов, собственно процесс лизиса.

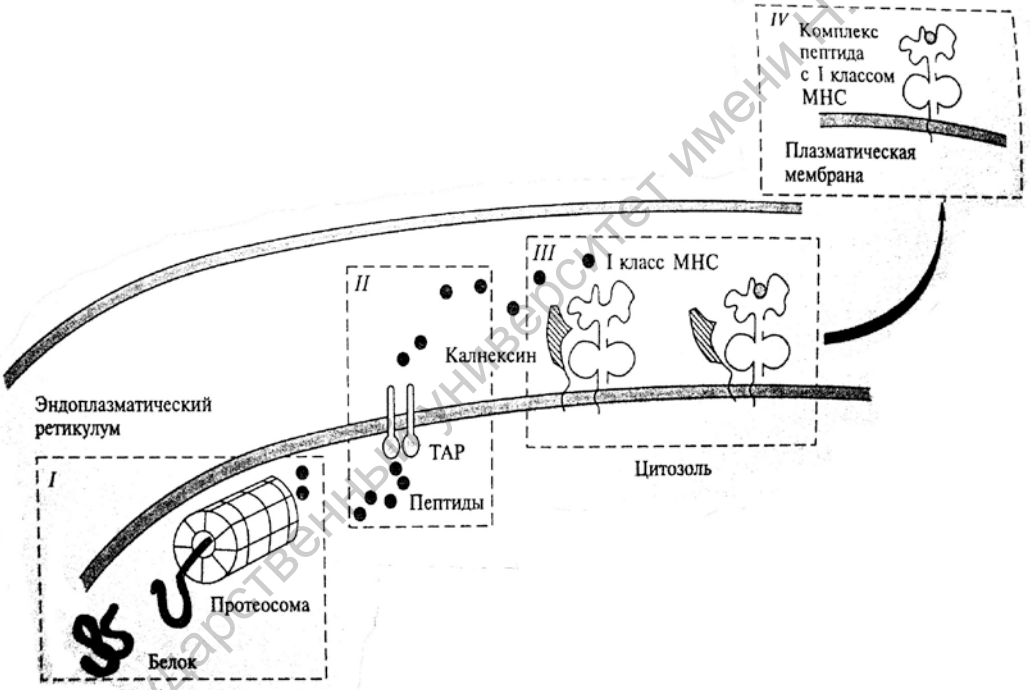

Рис. 6. Подготовка вирусных белков к взаимодействию с молекулами МНС I:
I – разрушение вирусных белков; II – транспортировка в эндоплпзматическую сеть;
III – взаимодействие с молекулами МНС;
IV – транспортировка комплекса к мембране клетки

Известны две формы гибели клеток: некроз и апоптоз. Первая из них связана с нарушениями в мембране или цитоплазме клеток и не затрагивает клеточного ядра. Некротическая гибель клеток-мишеней под влиянием ЦТЛ проходит в несколько этапов. Первый этап – специфическое связывание ЦТЛ с поверхностным чужеродным антигеном. Второй этап носит название «летального удара» и представляет собой основное событие, предопределяющее гибель клетки. Для него характерно повышение проницаемости клеточной мембраны, нарушение баланса натрий-калиевого

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

насоса. Факторами, повреждающими мембрану клетки, выступают перфорины и фрагментины. Третий этап, приводящий к лизису клетки, характеризуется увеличение ее объема за счет все большего проникновения воды через поврежденную мембрану. В результате происходит разрыв мембраны и гибель клетки (рис. 7).

Другая форма деструкции клетки, известная как запрограммированная смерть, или апоптоз, является физиологически нормальным процессом. Первичные изменения при апоптозе связаны с фрагментацией ДНК, разрушением ядра, изменением морфологии клетки. ЦТЛ индуцируют апоптоз, секретируя различные белки-цитотоксины. К ним относятся перфорины, фрагментины (гранзимы) и лимфотоксин (фактор некроза опухолей-β). Другой медиатор, секретируемый ЦТЛ, – интерферон-γ – оказывает прямое ингибирующее действие на размножение вирусов.

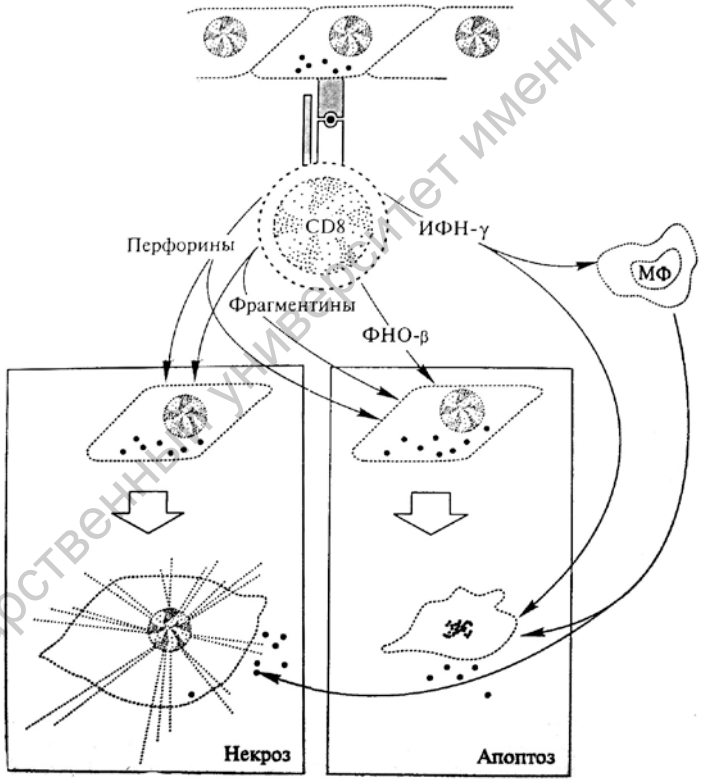

Рис. 7. Эффекторное действие цитотоксических лимфоцитов

Основную роль в реализации *гуморального ответа* играют В-клетки, которые под влиянием антигенного стимула синтезируют специфические антитела. Гуморальный иммунный ответ, направленный против внеклеточно расположенных вирионов, преследует две цели: препятствие адсорбции вирусов на поверхности чувствительных клеток и нейтрализацию вирусов. Главную протективную роль при этом играют специфические антитела – секреторный IgA и IgG. IgA, присутствующий на поверхности слизистых оболочек, препятствует адсорбции вирусов на эпителиальных

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

клетках, блокирует их перетрацию, связывает вирусные антигены и частично нейтрализует вирусы. IgG участвует в нейтрализации внеклеточных вирусов в кровяном русле и тканях.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕКУЩЕГО КОНТРОЛЯ ПО РАЗДЕЛАМ ДИСЦИПЛИНЫ

Раздел 1. Вирусология как наука. История развития вирусологии. Природа и происхождение вирусов.

1. Вирусология - наука о вирусах.
2. Место вирусологии среди биологических дисциплин.
3. История развития вирусологии.
4. Значение работ Э. Дженнера, Л. Пастера, Д.И. Ивановского и др. для развития вирусологии.
5. Основные периоды развития вирусологии.
6. Природа вирусов.
7. Гипотезы происхождения вирусов.

Раздел 2. Объекты изучения вирусологии: вирусы, прионы, вироиды.

1. Основные свойства вирусов.
2. Отличие вирусов от других организмов.
3. Особенности строения прионов.
4. Прионные болезни.
5. Особенности строения вироидов.
6. Болезни растений, вызываемые вироидами.

Раздел 3. Морфология и химический состав вирусов.

1. Форма и размеры вирусов.
2. Основные типы симметрии вирусов.
3. Химический состав вирусов.
4. Типы вирусных ДНК и РНК.
5. Структурные и неструктурные вирусные белки.
6. Липиды и углеводы вирусов.

Раздел 4. Особенности генетики вирусов. Генетические и негенетические типы взаимодействий у вирусов. Картирование вирусных геномов.

1. Генетический аппарат вирусов.
2. Способы увеличения генетической информации у вирусов.
3. Модификации и мутации у вирусов.
4. Генетические взаимодействия между вирусами.
5. Негенетические взаимодействия между вирусами.
6. Картирование вирусных геномов.

Раздел 5. Репродукция вирусов. Основные этапы жизненного цикла вирусов.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

1. Механизмы адсорбции вирусов на мембране клетки-хозяина.
2. Механизмы проникновения вируса в клетку.
3. Особенности репликации вирусных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине.
4. Типы репликации вирусных геномов.
5. Типы сборки вирусных частиц.
6. Способы выхода вируса из клетки-хозяина.

Раздел 6. Бактериофаги: строение, жизненный цикл, практическое использование.

1. Особенности строения бактериофагов.
2. Инфекционные и вегетативные бактериофаги.
3. Особенности жизненного цикла бактериофагов.
4. Применение бактериофагов для диагностики бактериальных инфекций.
5. Применение бактериофагов для терапия и профилактика инфекционных заболеваний.
6. Применение бактериофагов для генетических исследований.

Раздел 7. Классификация и номенклатура вирусов. Основные таксономические группы вирусов, патогенных для человека и животных.

1. Номенклатура вирусов.
2. Принципы систематики вирусов.
3. Критерии классификации вирусов.
4. Классификация вирусов по Д. Балтимору.
5. Основные систематические группы вирусов, патогенных для человека.

Раздел 8. Вирусные инфекции: классификация вирусных инфекций, патогенез.

1. Классификация вирусных инфекций на уровне организма.
2. Классификация вирусных инфекций на уровне клетки.
3. Цитопатология зараженной вирусом клетки.
4. Факторы патогенеза вирусов.
5. Механизмы передачи вирусов.
6. Факторы передачи вирусов.
7. Пути передачи вирусов.

Раздел 9. Вирусы – возбудители инфекционных заболеваний человека.

1. Вирусы – возбудители острых респираторных заболеваний.
2. Вирусы – возбудители острых кишечных инфекций.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

3. Вирусы – возбудители природно-очаговых болезней.
4. Вирус иммунодефицита человека.

Раздел 10. Современные методы вирусологических исследований и диагностики вирусных инфекций.

1. Использование лабораторных животных.
2. Использование куриных эмбрионов.
3. Использование культур клеток.
4. Иммунологические методы исследования.
5. Генетические методы исследования.

Раздел 11. Иммунная система и противовирусный иммунитет.

1. Особенности иммунной системы человека.
2. Антигены и антитела.
3. Клетки иммунной системы.
4. Главный комплекс гистосовместимости.
5. Врожденный противовирусный иммунитет.
6. Приобретенный противовирусный иммунитет.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ТЕМЫ РЕФЕРАТОВ К КУРСУ «ВИРУСОЛОГИЯ»

1. Диагностические иммунологические реакции, применяемые в вирусологических исследованиях.
2. Разнообразие бактериофагов.
3. Бактериофаги бактерий *E. coli*.
4. Вирусы – объекты молекулярной генетики.
5. Основные систематические группы вирусов, патогенных для человека.
6. Основные систематические группы вирусов, патогенных для беспозвоночных животных.
7. Основные систематические группы вирусов, патогенных для позвоночных животных.
8. Основные систематические группы вирусов, патогенных для растений.
9. Приспособление вирусов к внутриклеточному паразитизму.
10. Связь структуры вирусов с особенностями организации клетки хозяина.
11. Прионы: белки или живые организмы?
12. Вирусы цианобактерий и водорослей: видовое разнообразие, особенности строения и жизненного цикла, адаптация к хозяину.
13. Вирусы простейших: видовое разнообразие, особенности строения и жизненного цикла, адаптация к хозяину.
14. Вирусы грибов: видовое разнообразие, особенности строения и жизненного цикла, адаптация к хозяину.
15. Санитарная вирусология водных объектов.
16. Санитарная вирусология почвы.
17. Характеристика семейства Orthomyxoviridae (вирусы гриппа A, B, C).
18. Вирусные гепатиты.
19. Характеристика семейства Retroviridae (вирус иммунодефицита человека).
20. Характеристика семейства Herpesviridae.
21. Арбовирусные инфекции.
22. Энтеровирусы и ротавирусы (возбудители острых кишечных инфекций).
23. Характеристика семейства Picornaviridae (вирус ящура).
24. Характеристика семейства Rhabdoviridae (вирус бешенства).
25. Характеристика семейства Bunyaviridae.
26. Характеристика семейства Filoviridae (вирус Эбола, вирус Марбург).
27. Характеристика семейства Poxviridae (вирусы оспы).

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Задача 1. Обнаружение вирусов.

Активность бактериофага определяют по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или твердых средах. Для обнаружения бактериофагов в лабораторной практике наиболее часто используют два приема: метод негативных колоний и цветную пробу.

Негативными колониями или бляшками называют округлые прозрачные зоны отсутствия роста бактерий или культур клеток. Образование каждого стерильного пятна может быть вызвано единственной частицей бактериофага. Число негативных колоний может так же служить количественным показателем содержания инфекционных фаговых частиц в исследуемом растворе.

Цветная проба основана на различии в цвете среды, содержащей нормальную культуру клеток, и среды, содержащей культуру зараженных вирусом клеток. В процессе развития нормальной культуры клеток происходит накопление кислых продуктов обмена веществ, что приводит к сдвигу pH в кислую сторону. Поскольку среда культивирования содержит индикатор, то при изменении pH изменяется и ее цвет. Заражение культуры клеток вирусом приводит к развитию в ней дегенеративных процессов: подавление метаболизма, снижение гликолиза. В результате pH среды остается на исходном уровне, и ее цвет не изменяется. Так, по сохранению цвета среды можно судить о наличии или отсутствии вируса во внесенном в культуру материале.

Оборудование

- Суточная бульонная культура *E. coli*; суспензия бактериофага; суспензия вируса; культура клеток в среде 199 – 2 пробирки.
- Стерильная посуда: пипетки на 0.1 мл – 2 шт., пипетки на 1–2 мл – 2 шт.; шпатель – 1 шт.; чашка Петри с ГРМ-агаром – 1 шт.

Ход работы

1. Постановка эксперимента по обнаружению бактериофага методом негативных колоний.

С помощью стерильной пипетки внести 0.1 мл суспензии фага в бульонную культуру *E. coli*. Затем данную смесь в объеме 0.1 мл перенести на поверхность плотной питательной среды и равномерно распределить стерильным шпателем. Поставить чашку Петри с посевом в термостат на 37°С. Через 24–48 часов произвести учет результатов опыта путем подсчета стерильных зон на поверхности бактериального газона.

2. Постановка эксперимента по обнаружению вируса методом цветной пробы.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

В каждую из пробирок с культурой клеток внести по 0.1 мл суспензии вируса. Пробирки поместить в термостат на 37°С. Через 24–28 часов отметить цвет среды в каждой из пробирок.

На основании полученных результатов сделать вывод, об эффективности изученных методов для обнаружения вирусов.

Задача 2. Изучение явления лизогении.

Лизогения – взаимодействие между бактериофагом и клеткой-хозяином, при котором внутри бактериальной клетки существует умеренный фаг в стадии профага. Умеренными называют фаги, способные заражать бактерий-хозяев, но не размножающиеся в них и не вызывающие их лизиса. Профаг – это фаг, геном которого интегрирован в хромосому клетки-хозяина. Культура бактерий, содержащая профаг, называется лизогенной. Лизогенные бактерии устойчивы к заражению теми фагами, которые присутствуют в них в виде профага. При определенных условиях (например, во время облучения бактерий) фаг может перейти в свою активную форму, что приведет к лизису бактериальной клетки. Если смешать лизогенные бактерии с избытком бактерий- индикаторов и посеять смесь на агаризованную среду, то время от времени некоторые клетки будут лизироваться, выходящие из них фаговые частицы будут заражать индикаторные чувствительные бактерии. Это приведет к появлению бляшек в сплошном бактериальном газоне.

Оборудование

- Суточная бульонная исследуемая культура *E. coli* (лизогенная культура), 4.5 мл суточной бульонной индикаторной культуры *E. coli* (нелизогенная культура).
- Стерильная посуда: пипетки на 0.1 мл – 1 шт., пипетки на 1–2 мл – 2 шт.; шпатель – 1 шт.; стерильная чашка Петри – 1 шт.; чашка Петри с ГРМ-агаром – 1 шт.
- Источник УФ излучения.

Ход работы

1. Взвесь исследуемой лизогенной культуры объемом 0.5 мл поместить на дно стерильной чашки Петри. Чашку установить на расстоянии 30-40 см от источника УФ излучения.

2. Провести облучение исследуемой культуры УФ в течение 1 мин.

3. Исследуемую культуру из чашки Петри перенести в пробирку с 4.5 мл индикаторной нелизогенной культуры. Тщательно перемешать смесь пипеткой.

4. 0.1 мл смеси перенести на поверхность плотной питательной среды в чашку Петри и равномерно распределить стерильным шпателем. Поставить посев в термостат на 37°С.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

5. Через 24–48 часов произвести учет результатов опыта путем подсчета стерильных зон на поверхности бактериального газона на чашке Петри.

На основании полученных результатов сделать вывод о действии УФ излучения на лизогенные культуры бактерий.

Задача 3. Фаготипирование стафилококка.

В настоящее время среди методов идентификации микроорганизмов все большее значение приобретают те из них, при которых проводится внутривидовая диагностика бактерий. Фаготипирование – метод дифференциации бактерий внутри вида или серотипа с помощью бактериофагов. Принцип фаготипирования основан на специфичности бактериофагов по отношению к клеткам хозяина, которая проявляется в адсорбции его на поверхности строго определенных бактериальных клеток.

Фаги, специфически лизирующие бактерии одного вида, называются поливалентные диагностические фаги. Фаги, специфически лизирующие бактерии внутри вида, называются типовыми фагами. Наборы стандартных фагов, в том числе международные, используются для фаготипирования возбудителей ряда болезней (холеры, брюшного тифа, сальмонеллезов, дифтерии, стафилококковых и других заболеваний).

Оборудование

- Суточная бульонная культура *Staphylococcus aureus* – 1 пробирка; Международный набор типовых стафилококковых фагов (22 фага).
- Стерильная посуда: пипетка на 0.1 мл – 1 шт.; шпатель – 1 шт.; чашка Петри с ГРМ-агаром – 1 шт.

Ход работы

1. Дно чашки Петри с помощью воскового карандаша или маркера по стеклу разделить на квадраты по числу используемых фагов. Подписать наименования этих фагов в соответствии со схемой (рисунок).
2. Взвесь бактерий *S. aureus* в объеме 0.1 мл перенести на поверхность плотной питательной среды и равномерно распределить стерильным шпателем. Чашку подсушить в течение 5–10 мин.
3. С помощью бактериологической петли нанести каждый из набора типовых фагов на поверхность питательной среды в соответствующий квадрат. Поставить посев в термостат на 37°С.
4. Через 24–48 часов произвести учет результатов опыта путем анализа стерильных зон на поверхности бактериального газона (таблица).

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

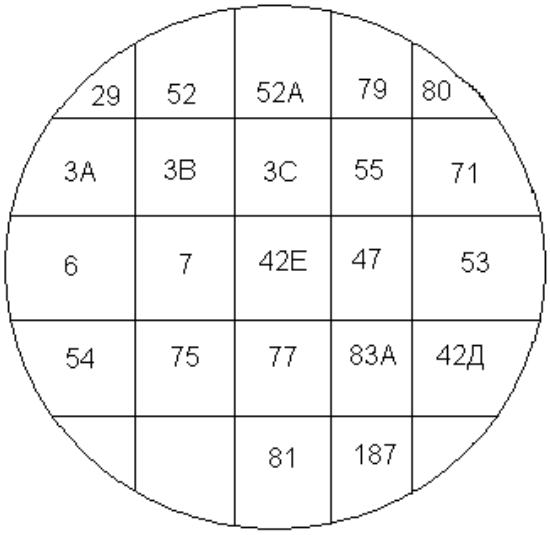

Рисунок. Схема нанесения типовых фагов при фаготипировании стафилококка

Схема фаготипирования стафилококка

Типовые группы штаммов (фаготипы)	Типовые фаги			
	A	B	F	L
I	-	29, 52, 79, 52A, 80	-	-
II	3A, 3B, 3C	55, 71	-	-
III	6, 7, 42E, 47, 54, 75	53	77	-
IV	83A	-	42Д	-
Негруппируемые штаммы	81	-	-	187

На основании полученных результатов сделать вывод о принадлежности исследуемого штамма к определенному фаготипу.

Задача 4. Генетическая рекомбинация мутантов фага.

В составе фагового потомства, образованного в результате совместного заражения одной бактериальной клетки двумя мутантами фага, наряду с родительскими типами могут быть обнаружены рекомбинантные варианты.

Рекомбинация реализуется в способности образовавшегося дочернего фага осуществить все этапы своего развития в условиях, неблагоприятных для каждого из исходных вариантов фага.

Примером рекомбинации может служить скрещивание между двумя мутантами – температурочувствительным (ts) и амбер-мутантом (am) фага Т4. Ts-мутант способен образовывать негативные колонии на газоне

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

E. coli дикого типа только при низких температурах (28°С). Am-мутант фага способен размножаться исключительно в клетках особого штамма *E. coli* CR63. В случае удачной рекомбинации образуется новый мутант фага, способный размножаться при высокой температуре в клетках *E. coli* дикого типа.

Оборудование

- Суточная бульонная культура дикого штамма *E. coli*; суспензия Ts-мутанта бактериофага, суспензия Am-мутанта бактериофага.
- Стерильная посуда: пипетки на 0.1 мл – 4 шт., пипетки на 1–2 мл – 2 шт.; шпатель – 1 шт.; чашки Петри с ГРМ-агаром – 2 шт.

Ход работы

1. В пробирку с бульонной культурой дикого штамма *E. coli* внести 0.1 мл суспензии Ts-мутанта бактериофага и 0.1 мл суспензии Am-мутанта бактериофага.

2. Через 10 мин высеять по 0.1 мл смеси из пробирки на 2 чашки Петри с плотной питательной средой и равномерно распределить стерильным шпателем.

3. Чашку Петри № 1 поместить в термостат на 28°С. Чашку Петри № 2 поместить в термостат на 37°С.

4. Через 24–48 часов произвести учет результатов опыта путем подсчета стерильных зон на поверхности бактериального газона на каждой из чашек.

Сделать вывод о способности мутантных вариантов бактериофагов к рекомбинации и значении этого процесса в природе.

Задача 5. Нейтрализация бактериофага специфичной антисывороткой.

При внутривенном введении кроликам разрушенных в результате действия вируса бактериальных клеток (фаголизатов) в сыворотке этих животных образуются специфические антитела. Полученные антитела способны нейтрализовать инфекционность гомологичных вирусных частиц (реакция нейтрализации). Скорость такой реакции зависит от концентрации фага, активности сыворотки, температуры и свойств среды.

Оборудование

- Суточная бульонная культура *E. coli* – 2 пробирки; суспензия бактериофага – 2 пробирки; антифаговая сыворотка.
- Стерильная посуда: пипетки на 0.1 мл – 4 шт., пипетки на 1–2 мл – 2 шт.; шпатели – 2 шт.; чашки Петри с ГРМ-агаром – 2 шт.

Ход работы

1. С помощью пипетки перенести 0.1 мл антифаговой сыворотки в каждую из пробирок с суспензией фага.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

2. Через 10 мин 0.1 мл суспензии фага из каждой пробирки добавить в соответствующую пробирку с бульонной культурой *E. coli*.

3. Смесь *E. coli* и бактериофага в объеме 0.1 мл перенести на поверхность плотной питательной среды и равномерно распределить стерильным шпателем. Поставить чашки Петри с посевами в термостат на 37°С.

4. Через 24–48 часов произвести учет результатов опыта путем подсчета стерильных зон на поверхности бактериального газона на каждой из чашек.

На основании полученных результатов сделать вывод об эффективности действия антифаговой сыворотки.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ВОПРОСЫ ДЛЯ СДАЧИ ЗАЧЕТА ПО КУРСУ «ВИРУСОЛОГИЯ»

1. Вирусология - наука о вирусах.
2. Место вирусологии среди биологических дисциплин.
3. История развития вирусологии.
4. Значение работ Э. Дженнера, Л. Пастера, Д.И. Ивановского и др. для развития вирусологии.
5. Основные периоды развития вирусологии.
6. Природа вирусов.
7. Гипотезы происхождения вирусов.
8. Основные свойства вирусов.
9. Отличие вирусов от других организмов.
10. Особенности строения прионов.
11. Прионные болезни.
12. Особенности строения вироидов.
13. Болезни растений, вызываемые вироидами.
14. Форма и размеры вирусов.
15. Основные типы симметрии вирусов.
16. Химический состав вирусов.
17. Типы вирусных ДНК и РНК.
18. Структурные и неструктурные вирусные белки.
19. Липиды и углеводы вирусов.
20. Генетический аппарат вирусов.
21. Способы увеличения генетической информации у вирусов.
22. Модификации и мутации у вирусов.
23. Генетические взаимодействия между вирусами.
24. Негенетические взаимодействия между вирусами.
25. Картирование вирусных геномов.
26. Механизмы адсорбции вирусов на мембране клетки-хозяина.
27. Механизмы проникновения вируса в клетку.
28. Особенности репликации вирусных нуклеиновых кислот в клетке-хозяине.
29. Типы репликации вирусных геномов.
30. Типы сборки вирусных частиц.
31. Способы выхода вируса из клетки-хозяина.
32. Особенности строения бактериофагов.
33. Инфекционные и вегетативные бактериофаги.
34. Особенности жизненного цикла бактериофагов.
35. Применение бактериофагов для диагностики бактериальных инфекций.
36. Применение бактериофагов для терапия и профилактика инфекционных заболеваний.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

37. Применение бактериофагов для генетических исследований.
38. Номенклатура вирусов.
39. Принципы систематики вирусов.
40. Критерии классификации вирусов.
41. Классификация вирусов по Д. Балтимору.
42. Основные систематические группы вирусов, патогенных для человека.
43. Классификация вирусных инфекций на уровне организма.
44. Классификация вирусных инфекций на уровне клетки.
45. Цитопатология зараженной вирусом клетки.
46. Факторы патогенеза вирусов.
47. Механизмы передачи вирусов.
48. Факторы передачи вирусов.
49. Пути передачи вирусов.
50. Вирусы – возбудители острых респираторных заболеваний.
51. Вирусы – возбудители острых кишечных инфекций.
52. Вирусы – возбудители природно-очаговых болезней.
53. Вирус иммунодефицита человека.
54. Использование лабораторных животных.
55. Использование куриных эмбрионов.
56. Использование культур клеток.
57. Иммунологические методы исследования.
58. Генетические методы исследования.
59. Особенности иммунной системы человека.
60. Антигены и антитела.
61. Клетки иммунной системы.
62. Главный комплекс гистосовместимости.
63. Врожденный противовирусный иммунитет.
64. Приобретенный противовирусный иммунитет.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ТЕСТЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Для выращивания культур клеток используют питательные среды:
А) среда 199;
Б) среда Игла;
В) среда Эндо;
Г) среда Хенкса;
Д) витаминная среда.

2. «Цветная» реакция позволяет определять:
А) наличие белков в структуре вириона;
Б) количество вирионов в исследуемых объектах;
В) количество бактериофагов в исследуемых объектах;
Г) наличие суперкапсида в структуре вириона;
Д) наличие вируса в культуре клеток.

3. Вирусы отличаются от всех других живых организмов по следующим свойствам:
А) наличие двух типов нуклеиновых кислот;
Б) наличие одного типа нуклеиновых кислот;
В) способность к бинарному делению;
Г) отсутствие собственных белоксинтезирующих систем;
Д) отсутствие собственных систем мобилизации энергии.

4. Вирусы состоят из следующих обязательных компонентов:
А) нуклеиновая кислота;
Б) капсид;
В) суперкапсид;
Г) гликопротеид;
Д) капсомер.

5. Капсид вирусов состоит из:
А) нуклеиновых кислот;
Б) гликопротеидов;
В) липопротеидов;
Г) ароматических углеводородов;
Д) белков.

6. Трансляция вирусных белков протекает:
А) на рибосомах клетки;
Б) в аппарате Гольджи;
В) внутри вириона;
Г) в клеточной стенке;
Д) в митохондриях.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

7. Синтез вирусных компонентов протекает в:
А) цитоплазме;
Б) ядре;
В) рибосомах;
Г) митохондриях;
Д) эндоплазматическом ретикулюме.

8. Бактериофаги можно обнаружить в:
А) почве;
Б) питьевой воде;
В) пищевых продуктах;
Г) сточных водах;
Д) фекалиях человека и животных.

9. Распространение вирусов в природе ограничивается следующими факторами:
А) отрицательные температуры в зимний период;
Б) неравномерное распределение растительности по земному шару;
В) распространение переносчиков;
Г) ареал хозяев;
Д) не ограничено.

10. Прионы и вирусы имеют следующие общие свойства:
А) являются внутриклеточными паразитами;
Б) вызывают медленные инфекции;
В) поражают только человека;
Г) имеют в составе генома один тип нуклеиновых кислот;
Д) являются инфекционными белками.

11. Жизненный цикл вирусов включает следующие стадии:
А) адсорбция, проникновение в клетку, внутриклеточное размножение, выход из клетки;
Б) трансляция, транскрипция;
В) транскрипция, адсорбция, репликация;
Г) адсорбция, эндоцитоз, выход из клетки.
Д) адсорбция, репликация, трансляция.

12. Лизогенной конверсией называют:
А) наследственную изменчивость бактерий;
Б) мутации бактериальных клеток;
В) изменение свойств бактерий под влиянием бактериофага;
Г) лизис бактериальных клеток;
Д) появление устойчивых к бактериофагам штаммам бактерий.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

13. Хвостовые нити бактериофага выполняют функции:
А) адсорбция на поверхности бактериальной клетки;
Б) лизис клеточной стенки;
В) проникновение в клетку;
Г) введение нуклеиновой кислоты вируса в клетку бактерии;
Д) введение вирусных белков в клетку.

14. Фаготипирование бактерий основано на:
А) специфическом взаимодействии бактерий и бактериофагов;
Б) лизисе чувствительных бактерий умеренными бактериофагами;
В) лизисе чувствительных бактерий вирулентными бактериофагами;
Г) взаимодействии различных типов фагов;
Д) взаимодействии различных видов бактерий.

15. Метод культивирования вирусов в клетках тканей из почек обезьян предложил:
А) Гудпасчур;
Б) Ивановский;
В) Дюльбеко;
Г) Эндерс;
Д) Пастер.

16. Энергозапасающей структурой у вирусов являются:
А) митохондрии;
Б) мезосомы;
В) капсид;
Г) ядро;
Д) все ответы не верны.

17. Первым обнаруженным вирусом был:
А) вирус оспы;
Б) вирус табачной мозаики;
В) вирус гриппа;
Г) вирус бешенства;
Д) вирус гепатита.

18. Вирус иммунодефицита человека относится к семейству:
А) Picornaviridae;
Б) Retroviridae;
В) Togaviridae;
Г) Poxviridae;
Д) Filoviridae.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

19. Умеренный фаг вызывает:
А) абортивную инфекцию;
Б) изменение свойств клетки-хозяина;
В) лизис бактериальных клеток;
Г) появление устойчивых к любым вирусам штаммов бактерий;
Д) хроническую инфекцию.

20. Вирусные антигены
А) находятся на поверхности капсида;
Б) находятся на поверхности клетки-хозяина;
В) имеют полисахаридную природу;
Г) вызывают образование антител;
Д) все ответы верны.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Абортивная инфекции – форма вирусной инфекции, при которой взаимодействие вируса с клеткой обрывается на какой-то стадии жизненного цикла.

Автономная инфекции – форма вирусной инфекции, при которой вирусный геном реплицируется независимо от клеточного генома.

Антиген – структурно-чужеродное для данного макроорганизма вещество, способное вызвать иммунный ответ.

Антитела – специфические белки иммуноглобулины, образующиеся в организме в ответ на появление антигенов.

Бактериофаги – вирусы бактерий.

Вирулентные фаги – вирусные частицы, способные вызвать продуктивную форму инфекции

Вирусология – наука, изучающая природу и происхождение вирусов, особенности их химического состава, генетики, строения, морфологии, механизмов размножения и взаимодействия с клеточными организмами.

Вирусы – особое царство живых организмов, характеризующихся ультрамикроскопическими размерами, обладающих только одним типом нуклеиновой кислоты, лишенных собственных систем синтеза белка и мобилизации энергии и являющихся абсолютными внутриклеточными паразитами.

Вирион – внеклеточная покоящаяся форма вируса.

Вироиды – инфекционные агенты, представляющие собой кольцевые молекулы РНК и вызывающие заболевания у растений.

Генетические методы – методы обнаружения и изучения вирусов, основанные на индивидуальных особенностях генома каждого вида вирусов.

Главный комплекс гистосовместимости (от англ. major histocompatibility complex – MHC) – группа близко сцепленных генов шестой хромосомы, кодирующих иммунологически значимые молекулы трех классов.

Дефектные вирусы – вирусы, способные репродуцироваться в присутствии полноценных вирусов или использовать белки вируса-помощника.

Жизненный цикл вирусов – внутриклеточный процесс размножения вируса, который зависит от вирусного генома.

Иммунитет – способ защиты организма от всех чужеродных веществ как эндогенной, так и экзогенной природы.

Иммунологические методы – методы обнаружения и изучения вирусов, основанные на специфических иммунологических реакциях.

Интеграционная инфекции – форма вирусной инфекции, при которой вирусный геном включается в состав клеточного генома.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Интерфероны – защитные гликопротеиды, вырабатываемые клетками млекопитающих и птиц в ответ на заражение их вирусами и относящиеся к неспецифическим факторам противовирусного иммунитета.

Инфекция – комплекс процессов, происходящих при взаимодействии инфекционного агента с организмом хозяина.

Капсид – белковая оболочка, в которую упакована вирусная нуклеиновая кислота.

Капсомеры – идентичные пептидные молекулы, из которых построен вирусная оболочка (капсид).

Латентная инфекция – форма вирусной инфекции, протекающая бессимптомно и сопровождающаяся либо нормальной репродукцией вируса, либо вирусоносительством.

Лизогения – взаимодействие между бактериофагом (в состоянии профага) и клеткой-хозяином, при котором она получает новые наследуемые признаки.

Лизогенная конверсия – изменение свойств бактериальной клетки, обусловленное внедрением в ее геном профага.

Медленная инфекция – форма вирусной инфекции, характеризующаяся продолжительным инкубационным периодом, длительным прогрессирующим течением болезни и заканчивающаяся тяжелыми расстройствами или, чаще, смертью.

Механизм передачи вируса – способ перемещения вируса в цепи чувствительных хозяев.

Патогенез вирусных инфекций – совокупность процессов, вызывающих заболевание и определяющих его развитие и исход.

Персистентная инфекции – форма вирусной инфекции, которая возникает при продолжительном взаимодействии вируса с макроорганизмом.

Прионы – низкомолекулярные, не содержащие нуклеиновых кислот белки, которые вызывают трансмиссивные губкообразные энцефалопатии.

Продуктивная инфекция – форма вирусной инфекции, связанная с размножением вируса в клетке и выходом из нее.

Профаг – интегрированный в геном клетки-хозяина вирусный нуклеиновый компонент.

Редуктивная инфекция – форма вирусной инфекции, при которой геном вируса встраивается в хромосому клетки-хозяина.

Самосборка вирионов – механизм, основанный на специфическом белокнуклеиновом и белок-белковом узнавании, приводящий к образованию вирионов из синтезированных клеткой-хозяином вирусных компонентов.

Саттелиты – неполноценные вирусы, репликации которых происходит только в присутствии другого вируса.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Суперкапсид (пеплос) – дополнительная липидная оболочка вируса с интегрированными в нее гликозилированными вирусными белками, имеющая клеточное происхождение.

Умеренные фаги – вирусные частицы, способные вызывать как продуктивную, так и редуктивную форму инфекции.

Фаготип – совокупность бактериальных штаммов, характеризующихся одинаковой чувствительностью к типовому набору бактериофагов.

Факторы передачи вируса – элементы окружающей среды, обеспечивающие передачу возбудителя инфекции в цепи чувствительных хозяев.

Хроническая инфекция – форма вирусной инфекции, характеризующаяся длительно текущим патологическим процессом и периодическими состояниями выздоровления и рецидивов.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 236 с.

Вопросы общей вирусологии: Учеб. пособие / Под ред. О.И. Киселева, И.Н. Жилинской. СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2007. 374 с.

Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб.: СпецЛит, 2002. 591 с.

Медицинская вирусология / Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. СПб: ЭЛБИ-СПб, 2002. 163 с.

Практикум по общей вирусологии: Учеб. пособие / Под ред. И.Г. Атабекова. М.: Изд-во МГУ, 2002. 184 с.

Агол В.И. Как вирусы вызывают болезни // Соросовский образовательный журнал. 1997. №9. С. 27-31.

Агол В.И. «Помехоустойчивость» вирусов // Соросовский образовательный журнал. 1999. №2. С. 52-57.

Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 236 с.

Букринская А.Г. Вирусология. В 3-х т. М.: Медицина, 1986. 336 с.

Букринская А.Г. Вирусология. В 3-х т. М.: Медицина, 1986. 496 с.

Букринская А.Г. Вирусология. В 3-х т. М.: Медицина, 1986. 452 с.

Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб.: СпецЛит, 2002. 591 с.

Вирусология. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Б. Мейхи. М.: Мир, 1988. 344 с.

Вирусология / Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа и др. М.: Мир, 1989. 492 с.

Вопросы общей вирусологии: Учеб. пособие / Под ред. О.И. Киселева, И.Н. Жилинской. СПб.: СПбГМА им. И.И. Мечникова, 2007. 374 с.

Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Академия, 2004. 528 с.

Жданов В.М., Гайдамович С.Я. Вирусология. М.: Медицина, 1966. 480 с.

Луговцев В.Ю., Васильев Д.А., Генинг Т.П. Классификация и номенклатура вирусов позвоночных. Ульяновск, 2002. 268 с.

Лурия С., Дарнелл Дж. Общая вирусология. М.: Мир, 1970. 425 с.

Медицинская вирусология / Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. СПб: ЭЛБИ-СПб, 2002. 163 с.

Общая медицинская вирусология / Под ред. Н.С. Горячкиной, Л.И. Кафарской. Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. 137 с.

Практикум по общей вирусологии: Учеб. пособие / Под ред. И.Г. Атабекова. М.: Изд-во МГУ, 2002. 184 с.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Сухов К.С. Общая вирусология. М.: Высшая школа, 1965. 299 с.

Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. М.: Колос, 2000. 272 с.

Френкель-Конрад Х. Химия и биология вирусов. М.: Мир, 1972. 340 с.

Цилинский Я.Я., Львов Д.К. Популяционная генетика вирусов позвоночных. М.: Медицина, 1977. 192 с.

Эпидемиология вирусных инфекций / Под. Ред. К.М. Синяка. Киев: Здоровье, 1977. 184 с.

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение……..…….……3
Содержание дисциплины……..……..…….…...4
Раздел 1. Вирусология как наука. История развития вирусологии. Природа и происхождение вирусов……...4
Раздел 2. Объекты изучения вирусологии: вирусы, прионы, вироиды……..…..…11
Раздел 3. Морфология и химический состав вирусов……..14
Раздел 4. Особенности генетики вирусов. Генетические и негенетические типы взаимодействий у вирусов. Картирование вирусных геномов…….20
Раздел 5. Репродукция вирусов. Основные этапы жизненного цикла вирусов……...……24
Раздел 6. Бактериофаги: строение, жизненный цикл, практическое использование……...…….28
Раздел 7. Классификация и номенклатура вирусов. Основные таксономические группы вирусов, патогенных для человека и животных……..…….....……...……35
Раздел 8. Вирусные инфекции: классификация, патогенез……...38
Раздел 9. Вирусы - возбудители инфекционных заболеваний человека……...……...…41
Раздел 10. Современные методы вирусологических исследований и диагностики вирусных инфекций ……...…49
Раздел 11. Иммунная система и противовирусный иммунитет……..55
Вопросы для проведения текущего контроля по разделам дисциплины……..62
Темы рефератов к курсу «Вирусология»……65
Лабораторные работы……...……..…..66
Задача № 1……...…66
Задача № 2……...…67
Задача № 3……...…68
Задача № 4……...……69
Задача № 5……...…70
Вопросы для сдачи зачета по курсу «Вирусология»……....……72
Тесты для самоконтроля……..……...…..74
Словарь терминов……..…….…...78
Список рекомендуемой литературы……..…….....81

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

Учебное издание

ВИРУСОЛОГИЯ. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Учебно-методическое пособие
для студентов биологического факультета,
обучающихся по направлению подготовки 020400 «Биология»

Авторы-составители:

Глинская Елена Владимировна,
Тучина Елена Святославна
Петров Сергей Викторович

Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского