**Можно ли считать вирусы живыми ? Являются ли вирусы живыми ?**

Согласно Львову, “организм - некая независимая единица интегрированных и взаимосвязанных структур и функций”. У простейших, то есть у одноклеточных именно клетка является независимой единицей, иными словами, организмом. И клеточные организмы - митохондрии, хромосомы и хлоропласты - это не организмы, ибо они не являются независимыми. Получается, что если следовать определению, данным Львовым, вирусы не являются организмами, так как не обладают независимостью: для выращивания и репликации генетического материала нужна живая клетка.

В то же время, у многоклеточных видов независимо от того, животные или растения, отдельные линии клеток не могут эволюционировать независимо друг от друга; следовательно, их клетки не являются организмами. Для того чтобы изменение было эволюционно значимым, оно должно быть передано новому поколению индивидуумов. В соответствии с этим рассуждением организм представляет собой элементарную единицу некоторого непрерывного ряда со своей индивидуальной эволюционной историей

Вирус обретает относительно независимую эволюционную историю благодаря его способности к адаптации в направлении, ведущим к приобретению им способности передаваться от хозяина к хозяину. Он может пережить клетку или организм, в которых паразитирует; фактически вирус часто “эксплуатирует” клетку. Один вирус может встречаться в разных видах, родах и типах и также один и тот же вирус может передаваться от растений насекомым и размножаться в клетках тех и других. Вирус, обладающий соответствующей приспособляемостью, может использовать разнообразные эволюционные ниши. Таким образом, вирус, конечно, обладает большей независимостью, чем любая клеточная органелла. То есть, в эволюционном плане вирус в большей степени организм, чем хромосома или даже клетка многоклеточного животного, хотя функционально он значительно менее независим, чем любая такая клетка.

И в то же время, можно рассматривать данную проблему с точки зрения другого определения: материал является живым если, будучи изолированным, он сохраняет свою специфическую конфигурацию так, что эта конфигурация может быть реинтегрирована, то есть вновь включена в цикл, в котором участвует генетическое вещество: это отождествляет жизнь с наличием независимого специфического самореплицирующегося способа организации. Специфическая последовательность оснований нуклеиновой кислоты того или иного гена может копироваться; ген - это некая часть запасов информации, которой располагает живой организм. В качестве теста на живое данное выше определение предлагает воспроизведение в различных клеточных линиях и в ряде поколей организмов. Вирус, согласно этому тесту, живой точно так же, как и любой другой фрагмент генетического материала, что его можно извлечь из клетки, вновь ввести в живую клетку и что при этом он будет копироваться в ней и станет хотя бы на некоторое время часть ее наследственного аппарата. При этом передача вирусного генома составляет основной смысл существования этих форм - результат их специализации в процессе отбора. Поэтому специализированность вирусов как переносчиков нуклеиновых кислот дает возможность считать вирусы “более живыми”, чем какие либо фрагменты генетического материала, и “более организмами”, чем любые клеточные органеллы, включая хромосомы и гены.

**Строгие постулаты Коха**

Каковы же те основные положения, сформулированные Робертом Кохом (1843-1910), которых должен придерживаться микробиолог при каждом обнаружении неизвестного возбудителя ? Что может служить доказательством, что именно он является причиной данного инфекционного заболевания ? Вот эти три критерия:

Неоднократное получение чистой культуры возбудителя, взятого из организма больного.

Возникновение точно такого же или сходного заболевания (как по характеру течения, так и по вызываемым им патологическим изменениям) при инфицировании здорового организма культурой предполагаемого возбудителя.

Появление в организме человека или животного после их заражения данным возбудителем всегда одних и тех же специфических защитных веществ. При контакте иммунной сыворотки крови с возбудителем из культуры последний должен терять свои патогенные свойства.

Для современной вирусологии характерно бурное развитие и широкое применение самых различных методик - как биологических (включая генетические), так и физико-химических.. Они используются при установлении новых, до сих пор еще неизвестных вирусов, и при изучении биологических свойств и строения уже обнаруженных видов.

Фундаментальные теоретические исследования дают обычно важные сведения, которые используются в медицине, в области диагностики или при глубоком анализе процессов вирусной инфекции. Введение новых действенных методов вирусологии связано, как правило, с выдающимися открытиями.

Так например, метод выращивания вирусов в развивающемся курином эмбрионе, впервые примененный А. М. Вудрофом и Е. Дж. Гудпэсчуром в 1931 году, был с исключительным успехом использован при изучении вируса гриппа.

Прогресс физико-химических методов, в частности метода центрифугирования, привел в 1935 году к возможности кристалмуации вируса табачной мозаики (ВТМ) из сока больных растений, а в последствии и к установлению входящих в его состав белков. Этим был дан первый толчок к изучению строения и биохимии вирусов.

В 1939 году А. В. Арден и Г. Руска впервые применили для изучения вирусов электронный микроскоп. Введение этого аппарата в практику означало исторический перелом в вирусологических исследованиях, поскольку появилась возможность увидеть - хотя в те годы еще и недостаточно четко - отдельные частицы вируса, вирионы.

В 1941 году Г.Херст установил, что вирус гриппа при известных условиях вызывает агглютинацию (склеивание и выпадение в осадок) красных кровяных телец (эритроцитов). Этим была положена основа для изучения взаимоотношений между поверхностными структурами вируса и эритроцитов, а также для разработки одного из наиболее эффективных методов диагностики.

Коренной перелом и вирусологических исследованиях произошел в 1949 г., когда Дж. Эндерсу, Т. Уэллеру и Ф. Роббинсу удалось размножить вирус полиомиелита в клетках кожи и мышц человеческого зародыша. Они добились разрастания кусочков ткани на искусственной питательной среде. Клеточные (тканевые) культуры были инфицированы вирусом полиомиелита, который до этого изучали исключительно на обезьянах и лишь очень редко на особом виде крыс.

Вирус в человеческих клетках, выращенных вне материнского организма, хорошо размножался и вызывал характерные патологические изменения. Метод культуры клеток (длительное сохранение и выращивание в искусственных питательных средах клеток, выделенных из организма человека и животных) был впоследствии усовершенствован и упрощен многими исследователями и стал, наконец, одним из наиболее важных и результативных для культивирования вирусов. Благодаря этому более доступному и дешевому методу появилась возможность получать вирусы в относительно чистом виде, чего нельзя было достичь в суспензиях из органов погибших животных. Введение нового метода означало несомненный прогресс не только в диагностике вирусных заболеваний, но и в получении прививочных вакцин. Он дал также неплохие результаты и в биологических и биохимических исследованиях вирусов.

В 1956 году удалось показать, что носителем инфекционности вируса является содержащаяся в нем нуклеиновая кислота. А в 1957 году А.Айзекс и Дж. Линдеман открыли интерферон, который позволил объяснить многие биологические явления, наблюдаемые в отношениях между вирусом и клеткой - хозяином или организмом - хозяином.

С. Бреннер и Д. Хорн ввели в технику электронной микроскопии метод негативного контрастного окрашивания, сделавший возможным изучение тонкого строения вирусов, в частности их структурных элементов (субъединиц).

В 1964 году уже упоминавшийся нами ранее американский вирусолог Гайдузек с сотрудниками доказал инфекционный характер ряда хронических заболеваний центральной нервной системы человека и животных. Он изучал недавно обнаруженные своеобразные вирусы, лишь в некоторых чертах схожие с ранее известными.

В то же время американский генетик Барух Бламберг обнаруживает (в процессе генетических исследований белков крови) антиген сывороточного гепатита (австралийский антиген), вещество, идентифицируемое при помощи серологических тестов. Этому антигену суждено было сыграть большую роль в вирусологических исследованиях гепатита.

В последние годы одним из крупнейших успехов вирусологии можно считать раскрытие некоторых молекулярно-биологических механизмов превращения нормальных клеток в опухолевые. Не меньшие успехи были достигнуты и в области изучения строения вирусов и их генетики.

**Инфекционная единица**

Наименьшее количество вируса, способное в данном опыте вызвать инфекцию, называется инфекционной единицей.

Для ее определения применяются обычно два метода. Первый основан на определении 50 %-ной летальной дозы, которая обозначается LD 50 (от лат. Letatis - смертельная, dosis - доза). Второй метод устанавливает число инфекционных единиц по числу бляшек, образовавшихся в культуре клеток.

Что, в сущности, представляет собой величина LD 50 и как она определяется? Исследуемый вирусный материал разводится в соответствии со снижающимися степенями концентрации, скажем кратными десяти: 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. Каждым из растворов с указанными концентрациями вируса инфицируют группу животных (десять индивидуумов) или культуру клеток в пробирках. Потом наблюдают гибель животных или изменения, происшедшие в культуре под влиянием вируса. Статистическим методом определяется степень концентрации, способная умертвить 50 % животных из числа зараженных исходным материалом. При использовании культуры клеток следует найти такую дозу вируса, которая производит губительное действие на 50 % инфицированных ею культур. В этом случае употребляется сокращение ЦПД 50 (цитопатическая доза). Иначе говоря, речь идет о такой дозе вируса, которая вызывает повреждение или гибель половины инфицированных ею культур.

Методом бляшек нельзя получить статистические данные, но можно установить фактическое число единиц вируса в материале, дающем бляшки в культуре клеток. В идеальном случае такая единица отвечает одной функционально полноценной частице.

**Титрование**

Индуцируемая вирусом реакция может происходить по типу “все или ничего” (то есть наличие или отсутствие инфекции), а может быть выражена количественно, например продолжительностью времени, необходимого проявления инфекции, или числом поражений в слое чувствительных клеток. Количественное определение вирусной активности называется титрованием. Титр исходной вирусной суспензии выражается числом инфекционных единиц, приходящихся на единицу объема. Инфекционные нуклеиновые кислоты, независимо от того выделены ли они из фагов или из вирусов животных или растений, как правило, обладают значительно меньшим инфекционным титром, чем исходный вирус (то есть отношение числа содержащихся в препарате молекул нуклеиновой кислоты к числу инфекционных единиц значительно больше, чем соответствующие величины для вирионов, из которых эти нуклеиновые кислоты были выделены). Однако и при титровании свободной нуклеиновой кислоты и при титровании вирионов вероятность нахождения в пробе среднего числа частиц выражается одной формулой. Отсюда следует, что вирусную инфекцию может вызвать также и одна молекула вирусной нуклеиновой кислоты. Как правило, инфекционными являются только интактные вирусные ДНК и РНК. Исключение наблюдается при множественном заражении клеток молекулами нуклеиновой кислоты, содержащими неполным геном вируса.

Резюмируя сказанное, можно прийти к выводу, что титр вирусной суспензии, выраженный числом инфекционных единиц, содержащихся в единице объема, как правило, соответствует числу вирионов (или числу молекул вирусной нуклеиновой кислоты), способных при условиях данного опыта вызвать инфекцию.

**Утрата инфекционности**

Как правило, чувствительность вирионов данного вируса к действию тех или иных инактивирующих веществ определяется специфическими свойствами его белков, вследствие чего методы инактивации инфекционности, разработанные для данного конкретного вируса, эффективны лишь в отношении близкородственных ему вирусов. Исключение составляет чувствительность вирусов к рентгеновским лучам, которая зависит от типа нуклеиновой кислоты вирионов и ее количества. В основе этой закономерности лежит тот факт, что действие рентгеновских лучей приводит к разрыву молекул нуклеиновой кислоты, и даже одного такого разрыва часто бывает достаточно для утраты инфекционного вируса. Результаты экспериментов показывают, что мелкие вирусы инактивируются рентгеновскими лучами значительно эффективнее, так как для них характерна большая величина отношения содержания в вирионе нуклеиновой кислоты к содержанию в нем белка, чем для крупных вирионов, более богатых белком.

**Серологические методы**

В целях определения вида данного вируса при изучении защитных процессов в организме больного человека или зараженного животного применяются серологические методы. Серология (от лат. Serum - сыворотка, жидкая составная часть крови) - это раздел иммунологии, изучающий реакции антигена специфическими защитными веществами, антителами, которые находятся в сыворотке крови. Антитела нейтрализуют действие вируса. Они связываются с определенными антигенными веществами, находящимися на поверхности вирусных частиц. В результате связывания молекул антител с поверхностной структурой вируса последний теряет свои патогенные свойства. Для установления уровня (количества) антител в сыворотке или определения типа данного вируса проводится реакция нейтрализации вируса . Ее можно проводить как на животных, так и на культуре клеток.

Минимальную концентрацию сыворотки, содержащей антитела, достаточную для того, чтобы нейтрализовать вирус, не дать ему проявить цитопатическое действие, называют титром сыворотки, нейтрализующей вирус. Эта концентрация может быть выявлена и с помощью метода бляшек.

Для обнаружения антител используется метод торможения гемагглютинации (склеивания эритроцитов под воздействием вируса) и метод связывания комплемента. Из методов, применяемых в вирусологии для различных исследовательских целей, можно еще упомянуть методы, при помощи которых вирусологический материал подготавливается для физических и химических анализов, которые облегчают изучение тонкого строения и состава вирусов. Эти анализы требуют большого количества совершенно чистого вируса. Очистка вируса - процесс, при котором из суспензии с вирусом устраняются все посторонние, загрязняющие ее частицы. В основном это кусочки и “обломки” клеток - хозяев. Одновременно с очисткой происходит обычно сгущение суспензии, повышение концентрации вируса. Так получается исходный материал для многих исследований.

Из отдельных методов очистки упомянем лишь наиболее эффективный - метод ультрацентрифугирования, который дает препараты вируса очень высокой концентрации.

Опишем вкратце процедуру получения и очистки вирусной суспензии. Процесс этот начинается с искусственного введения вируса в мозг подопытного животного. По прошествии нескольких дней вирус размножится в ткани мозга. При этом обнаружатся характерные нарушения функций нервной системы “хозяина”, и у животного выявятся признаки заболевания. Когда симптомы достигнут наибольшего развития, зверька умерщвляют, а его мозг, в тканях которого содержатся большие количества вируса, извлекают в стерильных условиях из черепа животного. Затем из мозга готовится, скажем ,10 %-ная суспензия. Кроме вирионов она содержит еще и большое количество кусочков нервной ткани, остатки кровеносных сосудов, кровяные тельца и другие биологические компоненты. Кусочки ткани и другие крупные частицы устраняются первым центрифугированием со скоростью 5000-10000 оборотов в минуту. Оно продолжается около получаса. Жидкость над осадком (суперкатакт) осторожно сливают в специальные пробирки для центрифугирования, сделанные из пластмассы или нержавеющей стали, поскольку стекло не выдерживает давление, которое развивается при высокоскоростном центрифугировании. А осадок обезвреживают дезинфицирующими средствами. Слитый “супернатант” обрабатывается затем уже в ультрацентрифуге.

Для седиментации мельчайших вирусов необходимо многочасовое ультрацентрифугирование, причем полученный осадок часто бывает не больше булавочной головки. Но и после такой обработки мы имеем не совсем чистый вирусный материал, в нем еще содержатся чужеродные примеси. Для тонких анализов этот осадок надо несколько раз обработать различными реактивами и повторить ультрацентрифугирование. Только тогда можно получить концентрированную суспензию вируса высокой чистоты, которая требуется для точных и достоверных биохимических, кристаллографических анализов или для наблюдений в электронно-оптических приборах.

В распоряжении вирусологов вообще много различных технических приспособлений, как , например , центрифугирование по градиентам концентрации, когда вирионы разделяются по степеням концентрации или по форме. Другой прибор, представляющий в наше время стандартное оборудование почти каждой научно-исследовательской вирусологической лаборатории - электронный микроскоп. Это дорогостоящий, большой и сложный аппарат.

Для получения изображения вирусов существует много различных методов, и все они прошли свои этапы развития. Чтобы обнаружить вирионы в клетках, в настоящее время пользуются методом ультратонких срезов Фиксированный материал, залитый эпоксидной смолой, разрезается тончайшим стеклянным или алмазным ножом. При помощи точных ультрамикротомов одну клетку можно разрезать более чем на тысячу тонких срезов. Полученные таким образом срезы обрабатываются затем специальными химикалиями, что обеспечивает лучшую их видимость.

Для наблюдения тонкого строения отдельных вирионов применяется метод негативного контрастирования (окрашивания), внедрение которого значительно повысило качественный уровень электронного микроскопирования. Вирусные частицы при этом осторожно смешиваются с раствором фосфовольфрамовой кислоты, дающей осадок, не пропускающий электронные лучи. В результате вирионы предстают в виде своих совершенно точных отпечатков, по которым можно изучать самые тонкие детали их поверхностей. При методе позитивного окрашивания (или “металлизирования” препарата) применяются такие вещества, которые способны выборочно прилипать к поверхности вирионов (например, специфические антитела, меченные ферритином, содержащим в своей молекуле железо и потому хорошо различимые в электронном микроскопе).

**Общие методы изучения вирусов**

О присутствии вируса в организме как при спонтанном заболевании, так и при экспериментальном заражении хозяина судят по появлению тех или иных патологических симптомов. Всякий раз, когда возникает подозрение о присутствии вируса в изучаемом объекте, приходится подбирать определенный комплекс условий - подходящий организм и соответствующий способ заражения, - при котором вирус вызывает в зараженном организме распознаваемые изменения. Так что вирусологам приходится затрачивать большие усилия на разработку методов получения экспериментальных инфекций.

Как известно, для доказательства того ,что данное заболевание действительно вызывается определенным микроорганизмом, необходимо выполнить так называемые постулаты Коха: 1) показать, что данный микроорганизм регулярно обнаруживается в больном организме; 2) получить культуру этого микроорганизма на искусственной питательной среде; 3) воспроизвести данное заболевание заражением экспериментального животного выделенной культурой и, наконец, ;4) повторно выделить данный микроорганизм, но теперь уже из организма искусственно зараженного хозяина. Те же постулаты mutatis mutandis справедливы и для диагностики вирусных заболеваний. В этом случае, согласно Риверсу, постулаты формируются следующим образом: 1) выделение вируса из организма больного, 2) культивирование вируса в организме или в клетках экспериментального животного, 3) доказательство фильтруемости инфекционного агента (чтобы исключить патогенные агенты большего размера, например бактерии), 4) воспроизведение подобного заболевания у другого представителя данного или родственного вида и, наконец, 5) повторное выделение того же вируса.

Культивирование и идентификация вирусов - основные вирусологические методы, используемые в практической вирусологии при диагностике вирусных заболеваний. Материал, в котором подозревается наличие вируса, например лизат бактерий, кусочек ткани или биологическая жидкость, при необходимости измельчают или гомогенезируют с тем, чтобы при контролируемых условиях перевести его в суспензированное состояние.

Большие фрагменты клеток, а также возможные загрязняющие материал микроорганизмы удаляют при помощи центрифугирования и фильтрования. Такую очищенную суспензию вводят подходящему хозяину, либо добавляют к суспензии клеток, либо наносят на монослой соответствующих клеток. В результате в слое чувствительных клеток, таких, как бактерии, растущие в чашке с агаром, или клетки животных, растущие на поверхности стекла, могут появиться локальные поражения, так называемые бляшки, которые характерны для данного вируса.. Бляшки образуются в результате заражения расположенных в данной области клеток, размножения в них вируса и их полного или частичного лизиса. Если размножение вируса не ведет к образованию визуально выявляемых дискретных бляшек, вирус может быть обнаружен и охарактеризован по изменениям, вызываемым им в культуре клеток, или по повреждению слоя клеток либо при помощи других тестов.

Если исследуемый материал не наносят на слой культивируемых клеток, а вводят в организм хозяина, то цель эксперимента - выявление общих реакций организма, свидетельствующих о развитии инфекции: появление симптомов заболевания, гибель животного или какие-либо иные специфические реакции, например образование антител.

Наконец, если ни заражение культуры клеток, ни введение материала в организм хозяина не ведут к появлению каких-либо симптомов вирусной инфекции, вирусологи прибегают к так называемым “слепым пассажам”, т.е. к повторным переносам исследуемого материала, что часто приводит к повышению вирулентности вируса или к увеличению его титра.

**Общий химический состав вирусов**

Непременным компонентом вирусной частицы является какая-либо одна из двух нуклеиновых кислот, белок и зольные элементы. Эти три компонента являются общими для всех без исключения вирусов, тогда как остальные двалипоиды и углеводы - входят в состав далеко не всех вирусов.

Вирусы, состоящие только из белка нуклеиновой кислоты и зольных элементов, чаще всего принадлежат к группе простых, так называемых минимальных, вирусов, лишенных дифференциации, собственных ферментов или каких-либо специализированных структур. К такого рода вирусам принадлежат вирусы растений, некоторые вирусы животных и насекомых. В то же время практически все бактериофаги, которые по химическому составу, безусловно принадлежат к группе минимальных вирусов, на самом деле являются очень сложными и высокодифференцированными структурами. Вирусы, в состав которых наряду с белком и нуклеиновой кислотой входят также липоиды и углеводы, как правило, принадлежат к группе сложно устроенных вирусов. Большая часть вирусов этой группы паразитирует на животных.

**Белки вирусов**

**Аминокислотный состав вирусных белков**

Белок всех исследованных до настоящего времени вирусов построен из обычных аминокислот, принадлежащих к естественному L-ряду. D-аминокислот в составе вирусных частиц не найдено. Соотношение аминокислот в вирусных белках достаточно близко к таковому в белках животных, бактерий и растений.

Вирусные белки не содержат обычно большого количества основных аминокислот (аргинина, муцина), т.е. не принадлежат к группе белков типа гистонов и протаминов с ярко выраженными щелочными свойствами. Не учитывая нейтральных аминокислот, можно сказать, что в вирусном белке преобладают кислые дикарбоновые кислоты. Это справедливо как для вирусов с низким содержанием нуклеиновой кислоты, так и для вирусов с высоким содержанием РНК и ДНК.

**Вирусная ДНК**

Главной структурной особенностью большинства вирусных молекул ДНК, как и ДНК из других источников, является наличие двух спаренных антипараллельных цепей. ДНК-геном вирусов, однако, невелик и поэтому здесь возникают вопросы, касающиеся концов спирали и общей формы молекулы ДНК, а не монотонной, фактически не имеющей концов “средней” части спирали. Полученные ответы оказались весьма удивительными: молекулы вирусных ДНК могут быть линейными или кольцевыми, двухцепочечными или одноцепочечными по всей своей длине или же одно цепочечными только на концах. Кроме того, выяснилось, что большинство нуклеотидных последовательностей в вирусном геноме встречается лишь по одному разу, однако на концах могут находиться повторяющиеся, или избыточные участки.

Из всех описанных до сих пор вирусных ДНК наиболее сложно организована ДНК вируса герпеса. Геном здесь, по-видимому, состоит из двух больших соединенных сегментов, каждый из которых имеет повторяющиеся концевые последовательности. Возможны четыре способа соединения двух таких сегментов конец в конец, и все они как будто бы встречаются в каждом препарате вирионов.

Наибольший из известных вирусов - вирус осповакцины имеет геном размером 15-108 дальтон. ДНК, выделенная из свежего препарата вирионов, по-видимому, имеет поперечные сшивки, так как не разделяется по две цепи. Одна из возможных моделей такой молекулы - гигантская, не подверженная денатурации кольцевая структура, образующаяся при замыкании концов линейной двойной спирали.

Помимо очень интересных различий в форме молекулы и в структуре концевых участков вирусных ДНК существуют также большие различия в величине генома. Среди наименьших “полных” вирусов (т.е. вирусов, способных размножаться в клетке-хозяине) можно назвать фаг ∅X174, парвовирусы, паповирусы, вирусы полиомы и SV40. С другой стороны, у крупных бактериофагов и вирусов человека и животных (паприляр, герпеса и осповакцины) геном значительно больше - от 1 до 1,5.108 дальтон, так что он мог бы кодировать более 100 белков. Действительно, у бактериофага Т4 сейчас идентифицировано больше ста генов.

В 1953 г. Уайетт и Коэн сделали неожиданное открытие, весьма существенное для последующих экспериментов: оказалось, что в ДНК Т-четных бактериофагов содержится не цитозин, а 5-гидроксиметилцитозин. Это отличие дало возможность изучать фаговые ДНК независимо от ДНК хозяина. Были открыты кодируемые фагом ферменты, которые изменяют метаболизм инфицированной клетки, и она начинает синтезировать компоненты, необходимые вирусу. Еще одно биохимическое отличие ДНК бактериофага состоит в том, что к ее гидроксиметилцитозину присоединены остатки глюкозы: последние, видимо, препятствуют прерыванию фаговой ДНК некоторыми ферментами хозяина.

В противоположность этому у вирусов животных ДНК почти не подвергается модификациям. Например, хотя ДНК клеток-хозяев и содержит много метилированных оснований, у вирусов имеется в лучшем случае лишь несколько метильных групп на геном. Большинство вирусных дезоксинуклеотидов не модифицированы, и поэтому нахождение несомненных модификаций представляло бы большой интерес.

**Вирусная РНК**

Исследования вирусной РНК составили один из самых значительных вкладов вирусологии в молекулярную биологию. Тот факт, что у вирусов растений реплицируемая генетическая система состоит только из РНК, ясно показал, что и РНК способна сохранять генетическую информацию. Была установлена инфекционность РНК вируса табачной мозаики, и выяснилось, что для инфекции необходима вся ее молекула; это означало, что интактность структуры высокомолекулярной РНК существенно для ее активности. Не менее важным результатом ранних исследований на том же вирусе явилась разработка методом выделения высокомолекулярной РНК и изучения ее свойств. Эти методы послужили в дальнейшем основой для изучения различных типов РНК, встречающихся у других вирусов.

Размеры вирионов РНК - вирусов сильно варьируют - от 7.106 дальтон у пикорнавирусов до >2.108 дальтон у ретровирусов; однако размеры РНК и, следовательно, объем содержащейся в ней информации различаются в значительно меньшей степени.

РНК пикорнавирусов - вероятно, наименьшая из известных - содержит около 7500 нуклеотидов, а РНК парамиксовирусов - едва ли не самая крупная - почти 15000 нуклеотидов. По-видимому, всем независимо реплицирующимся РНК-вирусам нужен какой-то минимум информации для репликационной системы и капсидного белка, но у них отсутствует очень сложная добавочная информация, которой могут обладать крупные ДНК-вирусы.

Вирусные белки

Кроме капсидных белков, образующих “футляр” для нуклеиновой кислоты, у вирусов с оболочками имеются и другие белки. Подобные примеры можно найти среди вирусов животных (в том числе насекомых), растений и бактерий. Кроме белков, входящих в состав нуклеопротеидного “ядра”, вирионы могут содержать еще вирус - специфические белки, которые были встроены в плазматические мембраны зараженных клеток и покрывают вирусную частицу, когда она выходит из клетки или “отпочковывается” от ее поверхности. Кроме того, у некоторых вирусов с оболочкой существует субмембранный матриксный белок между оболочкой и нуклеокапсидом. Вторую большую группу вирус-специфических белков составляют некапсидные вирусные белки. Они в основном имеют отношение к синтезу нуклеиновых кислот вириона.

**Аминокислотный состав вирусных белков**

Белок всех исследованных до настоящего времени вирусов построен из обычных аминокислот, принадлежащих к естественному L-ряду. Д-аминокислот в составе вирусных частиц не найдено. Соотношение аминокислот в вирусных белках достаточно близко к таковому в белках животных, бактерий и растений. Вирусные белки не содержат обычно большого количества основных аминокислот (аргинина, муцина), т.е. не принадлежат к группе белков типа гистонов и протаминов с ярко выраженными щелочными свойствами. Не учитывая нейтральных аминокислот, можно сказать, что в вирусном белке преобладают кислые дикарбоновые кислоты. Это справедливо как для вирусов с низким содержанием нуклеиновой кислоты, так и для вирусов с высоким содержанием РНК и ДНК.

**Химические субъединицы вирусных белков**

Резюмируется имеющийся в настоящее время материал о субъединицах вирусного белка, можно сделать вывод, что белковый компонент вирусов, как и все прочие белки, построен из пептидных цепочек. Единственное своеобразие полипептидной цепочки вирусного белка связано с “маскировкой” обеих или какой-либо одной С- или N - концевой аминокислоты, что, видимо, является эволюционным приспособлением, затрудняющим разрушение вирусного белка под влиянием протеаз в клетках хозяина. В вирусных частицах пептидные цепочки определенным образом взаимодействуют друг с другом, приобретая вторичную и третичную структуру. Именно в такой форме пептидные цепи являются структурными субъединицами вирусного белка, наблюдаемые обычно в электронном микроскопе.

**Некоторые общие свойства вирусных белков**

Пептидная цепь вирусного белка, за исключением “маскировки” С- или N-концевых групп, не обладает сама по себе какими-либо уникальными свойствами. Она легко гидролизуется протеазами и обнаруживает обычную, характерную для пептидов лабильность по отношению к ряду физических и химических факторов. В то же время белковая оболочка вирусов в целом характеризуется рядом уникальных особенностей. Прежде всего следует отметить устойчивость цельных частиц к протеолитическим ферментам, легко гидролизующим тканевые белки. В то же время в некоторых исследованиях сообщается о частичной или полной инактивации как очищенных препаратов вирусов, так и экстрактов, содержащих вирус после инкубации с различного рода протеолитическими ферментами любопытно, что даже близкородственные вирусы могут , по-видимому ,различаться по чувствительности к протеазам. Так, ни инфекционность, ни гемагглютинирующая активность вирусов гриппа А и С не изменились после инкубации с трипсином, тогда как в аналогичных условиях инфекционность препарата вируса гриппа В снижалась на 87 %, а титр гемагглютининов при этом не изменялся. Оценивая чувствительность того или иного типа вирусов к протеолитическим ферментам, следует так же иметь в виду, что вирусы обнаруживают дифференциальную чувствительность к различным протеазам. Вирус осповакцины, например, устойчивый к трипсину и химотрепсину, сравнительно быстро переваривается папоином, Однако как бы ни был решен впоследствии вопрос о действии протеаз на некоторые вирусы, следует все же помнить, что устойчивость к протеазам является широко распространенным свойством белковой оболочки неповрежденных вирусов. Поэтому при выделении вирусов часто применяют обработку вирусных препаратов протеометическими ферментами для удаления белковых загрязнений. Такая уникальная устойчивость вирусов к протеазам не связана с индивидуальными особенностями вирусного белка как такового, ибо при частичном повреждении или легкой денатурации вирусного корпускула, равно как и при выделении вирусного белка в чистом виде, последний легко переваривается протеазами. Поэтому устойчивость вирусных частиц к действию протеолитических ферментов нельзя объяснить какими-либо аномалиями в аминокислотном составе или наличием особого типа связей. Это свойство вирусов обусловлено структурными особенностями корпускула в целом, т.е. третичной и четвертичной структурой белка, и имеет большое биологическое значение, поскольку вирусы размножаются в клетках, содержащих большое количество протеолитических ферментов. Второй особенностью вирусного белка является , как правило, высокая устойчивость к воздействию ряда физических и химических факторов, хотя каких-либо общих закономерностей в этом отношении отметить не удается. Некоторые вирусные виды, выдерживающие необычайно жесткие режимы обработки, способны инактивироваться под влиянием такого невинного фактора, как пониженная или повышенная концентрация солей, лиофилизация и т.п. У четных Т-фагов отделение ДНК от белковых оболочек (“теней”) легко достигается быстрым изменением осмотического давления, так называемым “осмотическим шоком”, тогда как нечетные Т-фаги на быстрое уменьшение солевой концентрации среды не реагируют.

Так же резко различаются вирусы по своей устойчивости в солевых растворах. Одним из наиболее устойчивых в этом отношении является вирус папилломы кроликов, месяцами не теряющий активности в 2 %-ном растворе хлористого натрия и в полунасыщенном растворе сульфата аммония и сохраняющийся в течение десятков лет в 50 %-ном растворе глицерина на основании вышеприведенных фактов можно действительно прийти к выводу, что имеются очень стабильные и весьма лабильные виды вирусов, но чаще всего для вирусов характерна избирательная чувствительность к какому-либо определенному виду воздействий наряду с достаточной стабильностью нуклеопротеидной связи к ряду других факторов внешней среды. Стабильность того или иного вируса к определенным воздействиям нельзя считать неизменной, раз и навсегда данной видовой характеристикой. Она, наряду с другими свойствами вирусной частицы, может подвергаться самым радикальным изменениям в результате мутации. При оценке стабильности вирусных частиц необходимо также иметь в виду, что физическая и биологическая инактивация вирусов не всегда совпадает. Чаще всего эти понятия совпадают в случае простых вирусов, у которых отсутствуют специализированные структуры, ответственные за заражение клеток, а физическая и химическая структура вирусных частиц отличается высокой степенью гомогенности и одинаковым уровнем чувствительности по отношению к различного рода воздействиям. У более сложных вирусов очень часто биологическая инактивация связана с повреждением специализированных структур, определяющих адсорбцию вирусной частицы или введение в зараженную клетку нуклеиновой кислоты, хотя вирусный корпускул в целом остается неповрежденным. Из рассмотрения данных о стабильности вирусных частиц и изменений данной характеристики в процессе мутации становится очевидным, что какой-либо универсальной закономерности в этом отношении установить нельзя. Стабильность вируса к тем или иным физическим и химическим факторам определяется всей совокупностью особенностей первичной, вторичной и третичной структуры белка и нуклеиновой кислоты, а также их взаимодействием.

**Матричная РНК (м РНК) - промежуточный носитель**

**генетической информации**

Механизм, благодаря которому генетическая информация ДНК “транскрибируется” в матричную РНК, а затем транслируется в белок, выяснился через несколько лет после того, как молекулярные биологи осознали, что нуклеотидные последовательности в ДНК генов прямо ответственны за аминокислотные последовательности белка. Тот факт, что некоторые вирусы растений и животных содержат в качестве генетического материала РНК и что вирусная РНК сама по себе инфекционна, уже говорит о вероятной промежуточной роли РНК в переносе генетической информации. Когда Жакоб и Моно предсказали существование короткоживущего, нестойкого посредника между генами и аппаратом белкового синтеза, поиски молекулы РНК с такими свойствами были уже начаты. Первые указания на наличие фаговой РНК, которая вновь синтезировалась после фаговой инфекции и была ассоциирована с предсуществовавшими бактериальными рибосомами. Окончательное доказательство роли м РНК в синтезе полипептидов было получено в опытах с бесклеточной белок-синтезирующей системой. Экстракты нормальных клеток Е coli могли быть запрограммированы для синтеза специфических белков фага F 2 добавлением РНК из этого фага.

В дальнейшем м РНК была идентифицирована и изучена как в бактериальных, так и в животных клетках. Позже было показано, что многие молекулы м РНК, и вирусные и невирусные, способны программировать синтез специфических белков в самых разных клеточных экстрактах. Это подтверждало, что специфичность синтеза белка в различных системах зависит от м РНК, а не от системы, синтезирующей белок. Во всех клетках первым этапом экспрессии генов оказалась “транскрипция” ДНК с образованием соответствующей м РНК.

**Углеводы**

Четверым компонентом, обнаруживаемым иногда в очищенных вирусных препаратах, являются углеводы (в количестве, превышающем содержание сахара в нуклеиновой кислоте). Глюкоза и гентибиоза, обнаруживаемая в составе Т-четных и некоторых других фагов, - компоненты нуклеиновой кислоты и рассматриваются в разделе, посвященном составу ДНК и РНК. Помимо этих “экстра”-углеводов, в составе бактериофагов могут быть и другие полисахариды. Единственная группа вирусов, в которой наличие углеводов точно доказано, - вирусы животных, хотя различные авторы приводят весьма противоречивые данные как о количественном, так и о качественном составе их углеводного компонента. В составе элементарных телец вируса гриппа и классической чумы птиц находятся до 17 % углеводов.

**Ферменты вирусов**

**Аспекты проблемы**

Термин “ферменты вирусов” может употребляться в узком и широком смысле слова. В первом случае имеется в виду ферментативная активность, связанная с покоящимися вирусными частицами, с вирусом внеклеточным. Широкое толкование этого термина обозначает всю совокупность ферментных систем, принимающих участие в синтезе вируса в зараженной клетке, т.е. ферменты размножающегося внутриклеточного вируса.

Было доказано, что присутствие в вирусных препаратах одного фермента представляет собой достаточно редкий феномен, установленный в настоящее время с полной достоверностью для лизоцимной и фосфатозной активностей бактериофагов и нейтраминидазной активности миксовирусов. Во всех остальных случаях либо не было получено убедительных доказательств собственно вирусного происхождения определяемого фермента, либо, наоборот, твердо доказано происхождение активности фермента от клеточных загрязнений.

**Компоненты вирионов, не относящиеся к нуклеиновым кислотам и белкам**

Наиболее важный из таких компонентов мы уже упоминали это двойной слой липидов, образующий основную массу наружной оболочки у тех вирусов у которых она имеется. Полагают, что липиды оболочек просто заимствуются из плазматической мембраны клетки-хозяина и поэтому, строго говоря, не могут считаться “вирус-специфическими”. Действительно, парамиксовирусы , размножающиеся в различных клетках, могут содержать и соответственно разные липиды. Поэтому специфика вирусной оболочки зависит от вирусных гликопротеидов, находящихся на ее поверхности. Высокоочищенные препараты вирионов содержат ряд низкомолекулярных компонентов, функция которых в некоторых случаях понятна. У бактериофагов и вирусов животных и растений обнаружены полиамины. Возможно, что их единственная физиологическая функция состоит в нейтрализации отрицательного заряда нуклеиновой кислоты. Например, вирус герпеса содержит достаточно спермина, чтобы нейтрализовать половинку вирусной ДНК, а в вирусной оболочке, кроме того, присутствует спермидин.

В состав некоторых вирусов растений ( морщинистости турнепса, крапчатости фасоли, табачной мозаики) входит бис (3-аминопропил) амин. Полагают, что этот полиамин, подобно полиаминам фагов нейтрализует заряды вирусной РНК; поскольку он не был обнаружен в здоровых листьях, возможно, что он синтезируется только в зараженных клетках.

**Типы организации вирионов**

Основным структурным компонентом вириона является капсид, в котором заключена нуклеиновая кислота. Капсиды построены из белковых субъединиц, собранных строго определенным образом в соответствии с относительно простыми геометрическими принципами. Именно поэтому капсиды совершенно различных вирусов, например фагов, вирусов животных или вирусов растений, могут быть построены точно по одному плану и быть практически неразличимыми морфологически.

Крик и Уотсон, исходя из того, что содержащаяся в нуклеиновой кислоте вируса генетическая информация недостаточна для того чтобы вирус мог кодировать множество различных белков, пришли к выводу, что капсиды вирусов должны быть построены из множества идентичных субъединиц. Существуют два типа организации, при которой идентичные асимметричные субъединицы, такие, как молекулы белка, могут соединиться друг с другом с образованием правильного капсида: спиральная сборка и формирование замкнутых белковых оболочек. Соответственно существуют лишь два типа капсидов : спиральные и изометрические (или квазисферические); капсиды всех вирусов относятся к одной из этих двух категорий. Каждый из этих типов структур образуется белками капсидов в результате процесса, называемого самосборной. Этот процесс идет лишь в том случае ,если он энергетически выгоден. Это означает, что из всех возможных форм капсида реализуется именно та, которая отвечает минимуму свободной энергии специфических белков данного вируса. Реальная форма и размеры капсида, таким образом, определяются специфической формой молекул белка, являющихся субъединицами, из которых строится капсид, и характером связей, которые эти субъединицы образуют друг с другом. Стабильность структуры, возникающей в конечном счете, зависит от числа и силы слабых связей, образующихся между белками, входящими в состав данного капсида. Чем больше свободная энергия, выделяющаяся в процессе сборки капсида, тем прочнее собранный капсид.

Спиральные капсиды. Вирионы многих вирусов растений и ряда фагов имеют “голый” спиральный капсид, без внешней оболочки. Наиболее хорошо изученным вирусом данной группы является ВТМ.

Капсиды ВТМ - это относительно жесткие по структуре палочки. Столь же жестки по структуре капсиды по крайней мере еще одного фага. Капсиды других вирусов растений , например вируса желтухи сахарной свеклы и Х-вируса картофеля, тоже представляет собой спиралеобразные палочки, но палочки эти гибкие. Гибки также спиральные капсиды ряда обладающих внешней оболочкой вирусов животных. Гибкость этих палочковидных капсидов свидетельствует о том, что субъединицы, из которых они построены, образуют друг с другом менее прочные и более подвижные связи, чем те, которые образуются между субъединицами палочек типа вирионов ВТМ.

Изометрические (квазисферические) капсиды. Капсиды многих вирусов по форме почти идентичны сфере, однако электронная микроскопия показывает, что на самом деле эти капсиды представляют собой не сферы, а правильные многогранники. Такие капсиды называют изометрическими, так как их линейные размеры вдоль ортогональных осей идентичны.

Сложные капсиды. Серологические и морфологическое исследование капсидов показало, что они представляют собой сложные структуры. При детальном электронно-микроскопическом анализе строения капсидов на их поверхности части удается обнаружить выступы, иначе называемые шипами, которые обычно расположены на каждой из 12 вершин икосаэдра. Эти шипы играют важную роль в инициации инфекции. В литературе описан “волосатый” фаг, у которого от поверхности головки вириона отходят многочисленные фибриллы.

У самых крупных фагов имеются отростки, “хвосты”. Эти отростки являются органами, при помощи которых фаги прикрепляются к поверхности бактерии-хозяина. Существует мало биологических объектов, которые были бы более удивительны, чем Т-четные фаги.

Вирионы этих фагов собраны более чем из 50 видов различных белков и обладают высокоорганизованной, изумительно сложной и правильной структурой. Воротничок и базальная пластинка этих фагов обладают гексагональной симметрией. Белковая оболочка их головки представляет собой деформированный икосадельтаэдр с дополнительным рядом субъединиц, вследствие чего в одном направлении она длиннее, чем в других. Гексагональный отросток такого фага каким-то образом присоединен к макушке головки по плану пентагональной симметрии. При сборке фага Т4 иногда образуются вирионы с двумя отростками вместо одного. Многие вирусы животных, некоторые вирусы растений и, по крайней мере ,один класс бактериофагов имеют внешнюю оболочку, окружающую их капсиды. Неотъемлемой структурой этих оболочек, как и всех других биологических мембран, является двойной слой фосфолипидов, в который погружены молекулы специфических белков. В тех случаях, когда двойной слой фосфолипидов расположен на поверхности вириона и, следовательно, легко доступен для эфира или других растворителей липидов, вирионы легко разрушаются и интактивируются такими растворителями. Фосфолипиды внешних оболочек вирусов бывают идентичны липидам клетки-хозяина или сходны с ними, что, например, характерно для большинства оболочек вирусов животных, в других случаях наблюдаются достаточно выраженные различия между фосфолипидами. Оболочки вирусов животных формируются в составе плазматической или ядерной мембраны клетки. Электронные микрофотографии зараженных вирусами клеток показывают, что белки вируса появляются на небольших участках плазматической мембраны клетки, к которой в последствии мигрируют капсиды вируса, что, в конечном счете, ведет к формированию вириона и его отпочкованию. Следует, однако, подчеркнуть, что далеко не у всех вирусов животных вирионы имеют квазисферическую форму. Например, вирионы рабдовирусов по форме напоминают пулю; их оболочка, так же как и у других вирусов животных, образуется в результате отпочкования от плазматической мембраны клетки. Оболочки других вирусов, например вируса оспы, построены значительно сложнее и полностью формируются в цитоплазме клетки. Такие вирионы нечувствительны к действию эфира, не дают перекрестных иммунологических реакций с белками клетки-хозяина и, по-видимому, состоят только из компонентов, специфичных для вируса.

**Проблемы и методология**

Вирусная частица, или вирион, - это инертная статическая форма вируса. Когда вирионы находятся вне клетки, они не размножаются и в них не происходит никаких метаболических процессов. Все динамические события - биосинтез вирусных компонентов, повреждение организма-хозяина - начинаются лишь тогда, когда вирус проникает в клетку. Даже у многоклеточного хозяина решающие события при вирусной инфекции происходят на клеточном уровне. Распространение вируса совершается в результате повторных циклов взаимодействия вируса с клетками и рассеяния вирионов во внеклеточной среде. Все то, что мы уже знали о различных компонентах вирионов, заставляет предполагать, что внутри клетки-хозяина организация этих компонентов должна быть не такой, как в свободной вирусной частице. И действительно, в зараженных вирусом клетках происходит глубокая перестройка вирусного материала, а часто также и компонентов клетки-хозяина. Возникает новая система - комплекс вирус-клетка, функциональная организация, которой определяется взаимодействием вирусных и клеточных функций. Активные механизмы этого комплекса существенно отличаются от механизмов незараженной клетки.

**Фазы развития: эллипс, репликация и созревание**

С помощью различных методов было обнаружено много разнообразных ситуаций, которые, однако имеют между собой нечто общее, а именно то, что у каждого вируса взаимодействие с хозяином представляет собой специфическую последовательность событий. Каждый вирус - это организм со своими собственными процессами онтогенеза и морфогенеза, а также со своим филогенетическим прошлым. Однако циклы развития разных вирусов, если их рассматривать в широком плане, имеют ряд общих черт.

После прикрепления вируса в клетке происходит ряд событий, ведущих к освобождению вирусного генетического материала внутри клетки. При этом инфицирующие вирионы перестают существовать как организованные структуры. Так как инфекционность свободной вирусной нуклеиновой кислоты, как правило, намного меньше инфекционности цельного вириона, освобождение вирусного генома и переход его внутрь клетки-хозяина сопровождаются уменьшением или исчезновением инфекционности. Это явление получило название эклипса. Проникновение нуклеиновой кислоты вируса в клетку в процессе ее заражения может происходить различными способами. Например, у фагов, ингецирующих свою ДНК, ориентированным образом через оболочку бактериальной клетки, нуклеиновая кислота освобождается непосредственно у поверхности клетки. Некоторые фаги прикрепляются к жгутикам или ворсинкам бактерий, после чего вводят через эти органеллы свой генетический материал или же используют их для того, чтобы приблизиться к поверхности клетки. Вирусы, обладающие наружной оболочкой, могут сливаться с клеточной мембраной, и в цитоплазму клетки проникает весь внутренний капсид вируса, после чего происходит освобождение вирусного генома. Как только вирусный геном освободится от белка, он может служить источником информации как для репликации, так и для транскрипции , действуя как матрица для биосинтеза соответствующих продуктов. Размножение вирусных геномов идет путем репликации генетического материала, т.е. ДНК или РНК. Репликация ДНК происходит в основном с помощью тех же биохимических механизмов, что и репликация генетического материала клетки. Репликация вирусного ДНК-генома в клетке хозяина возможна, если геном является репликоном, который распознается репликационным аппаратом клеточного или вирусного происхождения. В процессе репликации могут совместно участвовать и клеточные и вирусные ферменты. В некоторых случаях репликация начинается лишь после ряда предварительных этапов и создания особых условий. При вирусной инфекции набор клеточных ферментов может пополняться - иногда за счет ферментов, привносимых в клетку вирионом (вирусы осповакцины, везикулярного стоматита и гриппа, ретровирусы), а иногда - за счет ферментов, вновь синтезируемых как продукты вирусных генов. Последние, в частности, доказано для некоторых фагов, для репродукции которых нужны особые компоненты ДНК. Эти фаги содержат информацию, необходимую для синтеза соответствующих ферментов. Вирусы могут также вызывать синтез ферментов, катализирующих реакции, которые уже ранее осуществлялись с помощью клеточных ферментов.

Большинство РНК-содержащих вирусов размножаются путем образования копий РНК без участия промежуточных ДНК-матриц, и поэтому их репликация может происходить в клетках с ингибированным синтезом ДНК. Эти вирусы кодируют собственную РНК-репликазу.

Клетки хозяина такого фермента не имеют. У некоторых групп РНК-содержащих вирусов РНК реплицируется на промежуточной комплиментарной ДНК, синтезируемой на вирусной РНК с помощью обратной транскриптазы. Этот фермент привносится в клетку хозяина вирионом вместе с вирусной РНК. Введение уже синтезированного вирусного фермента в клетку - явление не столь редкое.

Число компонентов биосинтетического аппарата, которое мог бы кодировать вирус, лимитируется величиной вирусного генома. Самые малые вирусы содержат около 106 дальтон ДНК или РНК. Так как соотношение молекулярных весов кодирующей нуклеиновой кислоты и кодируемого белка составляет примерно 9:1 для РНК или одноцепочной ДНК и 18:1 для двухцепочной ДНК, эти вирусы в состоянии обеспечить синтез лишь нескольких белков, и обычно это лишь структурные белки вириона. Очевидно, что все вирусы в значительной степени зависят от ферментного аппарата клеток - хозяев. Некоторые вирусы нуждаются даже в помощи других вирусов. Например, РНК вируса - сателлита некроза табака состоит всего из 1200 нуклеотидов, а белковая субъединица капсида, которую эта РНК кодирует, состоит из 400 аминокислотных остатков. Очевидно, что ни для какой другой информации в геноме этого вируса не хватило бы места. Поэтому он способен размножаться только в тех клетках, которые одновременно заражены вирусом некроза табака. Последний и служит источником необходимой репликазы. Есть и другие примеры вирусов, сохраняющихся в естественных условиях только благодаря вирусам - помощником, инфицирующим те же клетки.

Во время своей репликации вирусная нуклеиновая кислота не связана со специфическими белками, имеющимися в зрелых вирионах. При определенных условиях репликация нуклеионовых кислот происходит тогда, когда синтез белков химическим путем ингибирован. В ходе инфекции, ведущей к образованию и высвобождению новых вирусных частиц, синтез вирионных белков обычно начинается после того, как репликация нуклеиновой кислоты уже развернулась. В результате синтеза этих белков накапливается фонд предшественников, служащий источником материала, используемого при сборке капсидов. Созревание - сложный и необратимый процесс: ни нуклеиновая кислота, ни структурные белки, включенные в полный капсид или его часть, снова уже не освобождаются в той же клетке. Таким образом, при сборке капсида вирусный геном исключается из реплицирующейся популяции нуклеиновой кислоты, а капсидные белки - из фонда белковых предшественников. Если вирусы имеют наружную оболочку, то она присоединяется к капсиду позднее, либо в цитоплазме клетки, либо при взаимодействии с клеточной мембраной. Такой процесс сборки, включающий этапы наполнения предшественников позволяет объяснить явление фенотипического смешения, когда в клетке, зараженной двумя различными, но совместимыми вирусами, образуются вирионы с капсидами, построенными из субъединиц, кодируемых разными геномами.

Вновь образованные вирионы освобождаются во внешнюю среду (нередко вместе с незрелыми формами) либо в результате лизиса клетки - хозяина, вызываемого вирусными ферментами, как при инфекции бактерий фагами, либо путем выталкивания участков цитоплазмы, либо, наконец, путем выхода отдельных вирионов или небольших их групп. Некоторые вирусы животных с трудом освобождаются из клеток в культурах in vitro; в живом организме выходу таких вирусов из клеток и их распространению способствует захват поврежденных вирусом клеток фагоцитами и их переваривание. Вирусы растений обычно не освобождаются путем лизиса клеток, а переходят из клетки в клетку через межклеточные соединения.

**Взаимодействие фага с бактериями. Основные проблемы и явления**

Бактериофаги являются паразитами представителей почти всех групп прокариотических организмов от крошечных Dellovibrios, которые сами паразитируют на других бактериях, до некоторых крупных сине-зеленых водорослей. Общие свойства фагов обычно служат отражением свойств клетки бактерии-хозяина. Наличие жесткой клеточной стенки у большинства прокариот требует особых механизмов для проникновения или выхода вирусов. Прокариоты не дифференцируются в стволовые или специализированные клетки, а являются популяцией более или менее сходных клеток, которые продолжают размножаться, пока имеется соответствующая питательная среда. Поэтому взаимодействие фагов с бактериями происходит в бактериальной культуре циклически, пока не наступит некое равновесное состояние, которое определяется числом клеток-хозяев и вирусных элементов и скоростью их воспроизведения. Другая ситуация возникает тогда, когда бактерии способны к дифференцировке, например при споруляции или смене состояний.

**Прикрепление и проникновение**

Прикрепление вирионов фага к бактериальной клетке является реакцией первого порядка и происходит обычно на клеточной поверхности. Последняя различна по своей структуре у разных типов бактерий. Некоторые фаги прикрепляются к особым выростам, так называемым F и L-ворсинкам, которые принимают участие в процессе конъюгации. Вирионы фагов группы х обратимо прикрепляются к жгутикам бактерий и затем соскальзывают вдоль них к поверхности клетки, причем этому процессу, по-видимому, способствует движение самих жгутиков (поскольку неподвижные бактериальные мутанты не бывают хозяевами этих фагов). На поверхности бактериальной клетки имеются специфические рецепторы для фагов , однако данные об их природе весьма ограничены. Тот факт, что фаг неспособен адсорбироваться на бактериальном мутанте, не обязательно означает, что мутант утратил химические группы, выполняющие роль рецепторов фага, - последние могут быть просто скрыты другими компонентами клеточной оболочки. Рецепторы не всегда необходимы для самой клетки; например, при росте бактерий в определенных температурных условиях они могут утрачиваться.

Из оболочки бактерий, чувствительных к фагу, удается экстрагировать специфическое вещество, способное инактивировать фаг. Возможно ,это вещество является самим рецептором или компонентом рецепторной структуры на поверхности бактерий. Сами по себе рецепторы, по-видимому, способствуют лишь первому обратимому этапу адсорбции. Не исключено, что они также участвуют в других процессах, частности в транспорте ионов железа. После прикрепления фага бактерия в течение некоторого времени (латентный период) не претерпевает заметных морфологических изменений даже и в том случае, если заражение, в конце концов ,приведет к лизису клетки, поскольку лизис наступает всегда внезапно.

Проникновение фагового генома в клетку сопровождается физическим отделением нуклеиновой кислоты от большей части капсидных белков, которые остаются снаружи.

Кроме фаговой нуклеиновой кислоты внутрь бактериальной клетки инъецируется также небольшое количество белка и некоторые другие вещества, в том числе олигопептиды и полиамины. Роль этих веществ в процессе развития фага неизвестна, некоторые из них являются остатками протеолиза капсидных белков при сборке вирионов. Если бактериальные клетки способны поглощать свободную ДНК из среды, то и геном фага может проникнуть в них в виде свободных молекул ДНК. Это явление называют трансфекцией. Способность бактерий поглощать молекулы ДНК может возникнуть как нормальное явление на некоторых этапах роста, что наблюдается, например, у В subtilis.

В некоторых случаях такое состояние вызывается искусственно, как, например, у Е coli.

Процесс развития фага после трансфекции принципиально не отличается от происходящего при нормальной фаговой инфекции, за исключением того, что в этих случаях не наблюдается резистентности, вызываемой отсутствием рецепторов или другими свойствами оболочки клетки.

Проникновение генома фага в чувствительную к нему бактерию приводит либо к лизогенной, либо к литической инфекции, в зависимости от природы фага (а иногда и бактерии) и от окружающих условий, например температуры. При лизогенном типе взаимодействия геном фага в неинфекционной форме передается бактериальными клетками из поколения в поколение, причем время от времени в некотором количестве клеток синтезируются соответствующие вирионы, лизирующие эти клетки и выходящие затем во внешнюю среду. Лизогенные клетки, повторно зараженные этими вирионами, не лизируются (ибо они иммунны к этому фагу), так что лизогенная культура продолжает нормально расти. Присутствие свободных вирионов можно выявить путем воздействия на клетки каких-либо иных, нелизогенных штаммов бактерий, лизируемых данным фагом. Фаги, способные лизогенизировать заражаемые ими бактерии, называются умеренными, а фаги, у которых такая способность отсутствует, - вирулентными. Следует, однако, помнить, что даже умеренные фаги при первой инфекции чувствительных к ним бактерий вызывают продуктивную инфекцию у многих или даже у всех клеток. Возникновение лизогении и предупреждение созревания вирионов и лизиса клеток требуют серии определенных событий, которые вовсе не всегда случаются со всякой зараженной бактерией. Вероятность появления лизогении или продуктивной инфекции варьирует от фага к фагу и зависит от условий культивирования.

**Связь между строением вириона и началом инфекции**

Длинные нити (фибриллы) отростка служат для специфического узнавания фагом определенных участков на поверхности клетки-хозяина, к которым он прикрепляется. Мутации генов, кодирующих белки нитей, приводят к изменению или полной утрате способности фага прикрепляться к клетке-хозяину. Еще одним доказательством важной роли нитей отростков служат эксперименты с антифаговыми антисыворотками, показавшими что прикреплению фага к клеткам препятствуют только антитела к белкам дистальных частей концов нитей.

Нити обвиваются вокруг отростка таким образом, что их средняя часть поддерживается “усиками”, прикрепленными к тому месту, где головка соединяется с отростком. Синтез белка “усиков”, вероятно, кодируется геном wac. Соприкосновение концов нитей с рецептором клетки, возможно, обусловливает их разворачивание и выпрямление. Отличительное свойство фага Т4, которое легко утрачивается вследствие мутации и отбора, заключается в том, что освобождение нитей отростка от “усиков” зависит от L- триптофана как кофактора. Зависимость выпрямления нитей и последующего прикрепления фага к клетке от концентрации триптофана указывает на то, что контакт некоторых нитей с клеткой может способствовать освобождению остальных нитей. Для следующего этапа взаимодействия фага с бактерией необходимо правильное пространственное положение базальной пластинки отростка, что в свою очередь, обеспечивается, вероятно, контактом всех шести нитей с рецепторами клетки. По-видимому, прикрепление фаговой частицы с помощью нитей отростка позволяет ей производить определенные скользящие движения по поверхности клетки, пока не будет найден участок, через который можно ввести ДНК. В этом отношении весьма важным оказалось наблюдение, согласно которому необратимое прикрепление фага к клетке и проникновение в нее его ДНК происходят лишь на определенных участках оболочки (всего их около 300), где цитоплазматическая и внешняя мембраны образуют прочные контакты, устойчивые к мягкому осмотическому шоку. Это справедливо, вероятно, и для других бактериофагов. Весьма важно было бы выяснить, каково отношение этих участков к местам синтеза мембранных компонентов и фаговых рецепторов. На следующем этапе взаимодействия фага с клеткой происходит сокращение чехла отростка, в результате чего стержень проникает в клеточную оболочку. Сокращение стимулируется базальной пластинкой, изменяющей свою конформацию под влиянием нитей отростка. В процессе сокращения принимают участие все 144 субъединицы чехла, и их совместное перемещение приводит к уменьшению длины чехла в два раза. Было высказано предположение, что энергия для сокращения чехла поставляется молекулами АТФ, ассоциированными с фагом, однако окончательно это еще не доказано. Дистальная часть стержня подводится вплотную к внутренней цитоплазматической мембране, но не обязательно проникает через нее. ДНК из обработанных мочевиной фагов, имеющих сокращенные чехлы и экспонированные стержни, может проникать в сферопласты Е coli, у которых внешние мембраны и жесткие оболочки либо совсем удалены, либо в значительной мере разрушены. Заражение сферопластов, осуществляемой в гипертонических средах, приводит к образованию нормального фагового потомства. В сферопласты можно вводить цельные или фрагментированные молекулы фаговой ДНК, которые затем реплицируются и участвуют в рекомбинации.

Естественно, что в процессе заражения сферопластов поверхностные рецепторы не участвуют. Поэтому обработанные мочевиной фаги Т4 могут заражать устойчивые к ним мутанты Е. Coli или даже устойчивые бактерии отдаленных видов. Прикрепление к сферопластам фаговых частиц, обработанных мочевиной, блокируется фосфатидилглицерином, который, вероятно, является составной частью мембран, стимулирующей введение ДНК в клетку.

Если бактерию, уже зараженную Т-четным фагом, спустя несколько минут вновь инфицируют этим же фагом, то второй контингент фага не участвует в размножении (так называемое исключение при суперинфекции) и не передает своей ДНК потомству. Было показано, что ДНК фаговых частиц, попавших в клетку при повторном заражении, разрушается (разрушение при суперинфекции). Оба этих процесса находятся под контролем активируемых в клетке-хозяине фаговых генов, функция которых может нарушаться при соответствующих мутациях.

**Сборка вирионов**

В отличие от ранних этапов развития фага ход сборки капсидов и полных вирионов не программируется последовательной экспрессией фаговых генов. По-видимому, все белки вириона и другие поздние белки, как, например, лизоцим фага, синтезируются более или менее одновременно и, накапливаясь, образуют “фонд предшественников”. Отсюда они извлекаются путем прямого специфического взаимодействия с другими белковыми молекулами, в результате чего возникают субструктуры, которые затем собираются уже в цельные вирионы. Общий ход сборки стал понятен из результатов опытов in vivo с мутантными фагами и при изучении лизатов; однако после того, как была открыта возможность сборки предобразованных фаговых предшественников in vitro, с помощью этого эффективного метода было получено много новых данных. Сборка вириона состоит из четырех основных этапов, приводящих к образованию промежуточных структур, взаимодействующих между собой лишь в определенных критических точках.

Базальная пластинка фагового отростка построена из 15 белков, в синтезе которых , кроме основных ,участвуют и некоторые другие гены. Весьма интересно, что пластинка содержит, по-видимому, несколько молекул двух кодируемых фагом ферментов - дигидрофолатредуктазы и тимидилатсинтетазы, а также некоторое количество фолиевой кислоты.

Собранная базальная пластинка после присоединения к ней белка гена Б4 служит затравкой для сборки стержня отростка, состоящего из 144 молекул продукта гена 19. Вокруг стержня происходит сборка чехла, представляющего собой полимер, построенный из 144 молекул продукта гена 18. Продукты двух других генов стабилизируют всю эту структуру. Непонятно, каким образом достигается постоянство длины стержня при сборке. Возможно, что существуют еще какие-то линейные белки, отмеряющие нужное расстояние, или контакт с базальной пластинкой придает субъединицам стержня такую специфическую конформацию, которая имеет минимум свободной энергии только в случае определенного размера стержня. Эта последняя гипотеза указывает на то, что процесс сборки, возможно, не является чисто механическим.

Оболочка фаговой головки, построенная из более чем 10 белков, образуется в результате активности многих генов. Основной из них представляет собой продукт гена 23, входящий в состав законченной головки лишь после отщепления от основного полипептида фрагмента с мол. весом 10000. Протеолиз осуществляется главным образом продуктом гена 22, а также, возможно, гена 21, отсутствующим в зрелом вирионе. Однако белок гена 22 представляет собой, по существу, внутренний белок, превращающийся в ,конце концов, в результате самопереваривания в мелкие пептиды, причем некоторые из них остаются в головке фага. Здесь присутствуют также и другие внутренние белки, подвергающиеся частичному перевариванию белком гена 22.

После окончания раздельной сборки головки и отростка они самопроизвольно объединяются как in vitro, так и in vivo.

Нити отростка состоят из продуктов четырех генов. Их сборка идет независимо, но прикрепляются они к базальной пластинке только после соединения головки и отростка. Для этой реакции нужен белок гена 63, а также взаимодействие с “усиками”, которые прикреплены к воротничку, расположенному между головкой и отростком.

Головка фага имеет специфическую форму, определяемую белком гена 23 и другими белками. Ее строение изменяется в результате мутаций соответствующих генов. Нормальная головка фага 74 имеет форму неправильного икосадельтаэдра, по длинной оси которого расположен дополнительный ряд субъединиц, состоящих из 840 копий белка гена 23. Субъединицы белка гена 20 располагаются на вершинах. Такая форма головки отражает наличие определенных пространственных ограничений, накладываемых белок - белковыми взаимодействиями. При отсутствии этих ограничений строение фага сильно изменяется.

**Бактериофаг λ**

Бактериофаг λ является умеренным фагом, т.е. он может либо переходить из клетки в клетку в процессе инфекции, либо передаваться от одного поколения к другому в ходе размножения данного бактериального штамма. В последнем случае латентный геном фага называется профагом, а клетки, несущие такой профаг, - лизогенными. Присутствие генома фага в лизогенной культуре можно обнаружить при спонтанном освобождении фага из небольшой части клеточной популяции, в которой произошло спонтанное развитие фага.

Естественным хозяином фага λ служит штамм Е coli K 12, генетика которого хорошо изучена. Поэтому фаг λ был избран в качестве объекта интенсивных исследований, направленных на выяснение природы лизогении. Исходный дикий штамм К 12 является лизогенным по фагу , который не образует бляшек на этом штамме, обладающем, подобно большинству лизогенных бактерий, иммунитетом по отношению к фагу, содержащемуся в нем в виде профага. Обычно фаг λ размножается на вариантах штамма К 12, “извлеченных” от профага. Такие извлеченные варианты обнаруживаются в небольших количествах среди клеток, выживших после интенсивного облучения. При образовании устойчивой лизогенной клеточной линии должны быть выполнены следующие два условия. Во-первых, профаг должен находиться в клетке в таком состоянии, чтобы при клеточном делении каждая дочерняя клетка получала по крайней мере одну его копию. В случае фага λ эта задача решается путем включения его ДНК в бактериальную хромосому, в результате чего ДНК профага пассивно реплицируется и сегрегируется с помощью аппарата клетки-хозяина. Во-вторых, те вирусные гены, продукты которых потенциально способны нарушить целостность клетки, должны регулироваться таким образом, чтобы клетки могли благополучно расти и размножаться. Это достигается путем репрессии транскрипции генов. В клетках, лизогенных по фагу λ, не транскрибируется ни один из вирусных генов, необходимых для продуктивной инфекции. В лизогенных культурах обнаруживается лишь очень небольшое количество вирусной м РНК.

**Вирусы животных**

**Адсорбция и проникновение в клетку**

Первые этапы вирусной инфекции, независимо от того, о каком вирусек идет речь, традиционно принято называть адсорбцией, проникновением и “раздеванием” (разрушением вирусной оболочки). Под адсорбцией принято понимать первичный контакт вируса с клеткой. Часто этот контакт сначала бывает очень слабым - обратимая адсорбция. Затем прочность контакта возрастает - необратимая адсорбция. Эти термины в равной степени приложимы для описания начальной стадии проникновения в клетки любых вирусов. Термин “проникновение” ошибочен потому, что он подразкмевает активное воздействие на атакуемую клетку определенной части вириона, что не было доказано. Более вероятно, что во многих случаях на самом деле имеет место совсем другой процесс - прикрепление вируса к клетке вследствие физико-химической комплементарности между поверхностью вируса и молекулами рецепторов, находящихся на поверхности клетки, индуцирует в клетке изменения, необходимые для проникновения в нее вируса.

**Общая картина адсорбции вирусов животных**

Результаты, полученные при изучении адсорбции на клетках самых различных вирусов животных (как с оболочкой, так и без нее), создают следующую общую картину процесса прикрепления вируса к клетке. Процесс начинается со случайных столкновений мнрожества вирионов с поверхностью клетки, но к образованию связи между физически комплементарными друг другу участками поверхности клетки и вириона ведет лишь одно столкновение из каждых 10з или 104. Возможно, что в образовании таких связей принимают участие и ионы культуральной среды. Непосредственно реализовать эти связи могут находящиеся на поверхности вирионов выступы, состоящие из особых вирусных белков, такие, как “шипы” у вирусов с оболочкой, например микровирусов, тогавирусов и парамиксовирусов, или белковые нити (фибриллы), отходящие от вершин икосаэдрических вирионов (например, у некоторых аденовирусов). Участок связывания на поверхности вириона, непосредственно взаимодействующий с рецептором клетки, может состоять из индивидуального структурного вирусного белка, а может и представлять собой мозаику из нескольких белков капсида (по-видимому, именно так обстоит дело у пикорнавирусов). Рецептором во всех случаях служит расположенный на поверхности клетки белок или гликопротеид. На поверхности клетки имеются различные рецепторы, каждый из которых специфичен для своего вируса. Специфичность этих рецепторов не абсолютна, что приводит к возможности группировки вирусов по этому свойству в своеобразные “семейства”. Вирусы, родственные друг другу по данному признаку, могут быть родственны и по другим признакам, однако это условие не является обязательным. На поверхности единичной клетки может содержаться от 104 до 105 копий каждого вида рецептора.

Следует подчеркнуть, что сам факт адсорбции вируса на клетке еще никоим образом не означает инициации вирусной инфекции. Связи, образующиеся при адсорбции между вирусом и клеткой, могут быть “слабыми”,, а адсорбция “обратимой”, т.е. вирион может покидать поверхность клетки. Однако некоторые из адсорбировавшихся на клетке вирионов связываются с ней более прочными “необратимыми” связями.

Проникновение вирусов животных в клетку и “раздевание”.

Следующий этап после прочного прикрепления вириона к поверхности чувствительной клетки - это проникновение внутрь клетки всего вириона или его части и начало синтеза вирус-специфического белка или вирусной м РНК. В основе начального связывания самых различных вирусов с клеткой могут лежать принципиально сходные процессы. Напротив, проникновение вирионов в клетку и активация вирусного генома могут происходить у разных вирусов по-разному. Ясно, что вирусы с оболочкой и “голые” вирусы должны проникать в клетку в результате разных физико-химических процессов. Уже давно предполагали, что в основе проникновения в клетку вирусов с оболочкой, вероятно, лежит процесс, в какой-то мере подобный “плавлению мембраны”, или процесс “слияния”. Что же касается таких относительно больших белковых структур, как голые вирионы, то для них известен только один механизм проникновения в клетку - это фагоцитоз, и уже давно предполагается, что такие вирусы проникают в клетки в результате варианта фагоцитоза, названного “виропексисом”. В последние года стала известна еще одна важная подробность, касающаяся проникновения вирусов в клетки. Действительно, в ряде случаев единственным компонентом вириона, непосредственно ответственным за синтез новых компонентов вируса, является его нуклеиновая кислота, а в других еще и входящая в состав вириона РНК- или ДНК-полимераза.

**Размножение вирусов животных**

**РНК-содержащие вирусы**

Одно из резких различий между вирусами бактерий и вирусами животных состоит в неодинаковой продолжительности их одиночного цикла репродукции. Так, одиночный цикл репродукции даже у наиболее быстро размножающихся вирусов животных продолжается 5-6 г, а у ряда других вирусов - несколько дней. Кроме того, многие вирусы вызывают лишь персистентные инфекции, при которых клетки-хозяева не погибают, хотя вирус все время образуется и в них и в их потомках. Столь длительный цикл репродукции вирусов животных по сравнению с более коротким циклом репродукции большинства фагов, вероятно, зависит от относительных размеров соответствующих клеток-хозяев.

Многие особенности вирусов животных связаны со специфическими особенностями архитектуры эукариотических клеток. ДНК большинства ДНК-содержащих вирусов синтезируется в ядре клетки. Напротив, белки всех без исключения вирусов синтезируются в цитоплазме. Заражение клеток вирусами в принципе может привести к двум последствиям. Зараженная клетка может либо погибнуть, образовав при этом большое количество вируса (литический тип взаимодействия вирусов с клетками), либо продолжать жить и делиться, синтезируя небольшие количества вируса. Культуры размножающихся клеток, продуцирующих вирус, называют персистентно инфицированными. Почти любой вирус животных при соответствующих условиях может вызвать персистентную инфекцию. Более того, многие вирусы лизируют клетки очень редко, и обычно в зараженных клетках устанавливается состояние устойчивого равновесия - образуется персистентно инфицированная культура клеток.

Установлено, что при успешной литической инфекции в зараженных клетках происходит пять четко отличающихся друг от друга событий, реализуемых функционально активными вирус-специфическими белками. В ходе одиночного цикла репродукции вируса эти события развиваются либо параллельно, либо последовательно. Их временная последовательность определяется специфическими свойствами каждого вируса. Это следующие события: 1) подавление вирусом ряда клеточных функций; 2) синтез вирусных м РНК; 3) репликация вирусного генома; 4) морфогенез вирионов; 5) освобождение вирионов из клетки.

Согласно правилам спаривания оснований по Уотсону и Крику, для каждой данной молекулы РНК можно записать комплементарную ей нуклеотидную последовательность. Для удобства классификации вирусов вирусную м РНК условно обозначают как “плюс”-цепь, а комплементарную ей последовательность, как “минус”-цепь. Исходя из структурной взаимосвязи между нуклеиновой кислотой вириона и его м РНК, все вирусы животных можно разделить на шесть классов. Конечно, эту классификацию можно применить также и к бактериофагам, и к вирусам насекомых, и растений, но в настоящее время разумнее всего ограничить ее применение вирусами животных.

К классу I относятся вирусы, содержащие двухцепочечную ДНК, например вирус осповакцины

м РНК этих вирусов синтезируется таким же образом, как и клеточные м РНК, геном вируса - двухцепочечная ДНК - служит матрицей для синтеза м РНК. Класс II включает вирусы, содержащие одноцепочечную ДНК. Их м РНК по нуклеотидному составу, вероятно, полностью гомологична ДНК вириона. Поэтому м РНК должны транскрибироваться с “минус”- цепи ДНК, входящей в состав репликативного промежуточного комплекса-вируса. К остальным классам относятся вирусы, у которых геном служит РНК. Класс III включает вирусы, содержащие двухцепочечную РНК, например реовирусы. Эта РНК служит мартицей для асимметричного синтеза вирусных м РНК. Оказалось, что у всех до сих пор обнаруженных вирусов класса III геном сегментирован, т.е. состоит из множества хромосом, каждая из которых кодирует один полипептид. Вирусы, относящиеся к классу IV, содержат “плюс”-цепи РНК. Геном этих вирусов имеет ту же полярность, что и их м РНК. Вирусы данного класса делятся на два подкласса. У вирусов подкласса Ivа, типичным представителем которых является вирус полиомиелита, все белки синтезируются при трансляции одной-единственной молекулы м РНК. Образующийся при этом полипротеин расщепления затем протеолитическими ферментами с образованием функционально активных белков. Все м РНК этих вирусов имеют ту же длину, что и РНК-геном. Вирусы подкласса Ivв называют также тогавирусами. Они синтезируют в клетке по меньшей мере два вида вирусных м РНК: м РНК одного вида имеет ту же длину, что и РНК вириона, а м РНК второго вида представляет собой фрагмент РНК вириона.

Вирусы класса V называют также “минус” - РНК-вирусами. По нуклеотидной последовательности м РНК этих вирусов комплементарна РНК вирионов. Следовательно, вирион содержит матрицу для синтеза м РНК, но не для синтеза белков. Различают два подкласса вирусов класса V. Геном вирусов подкласса Vа представляет собой одну молекулу РНК, с которой транскрибируется целый ряд м РНК, причем все до сих пор изученные м РНК этих вирусов моноцистронные. Вирусы подкласса Vв имеют сегментированный геном. Каждый из сегментов генома служит матрицей , с которой транскрибируется лишь один вид молекул м РНК. Один из этих м РНК кодируют мноцистроенные, а другие - полицистроенные полипротеины. Вирусы, относящиеся к классу VI, называют также ретровирусами. Это самые необычные из всех известных РНК-содержащих вирусов, ибо при транскрибировании их РНК синтезируется не РНК, как обычно, а ДНК, которая в свою очередь служит матрицей для синтеза м РНК. Следовательно м РНК этих вирусов и РНК их вирионов не отличаются по полярности друг от друга, а некоторые из них идентичны и по длине. Из удивительных свойств этих генетических систем вытекает не мало замечательных следствий.

**Плюс - РНК-вирусы:**

**пикоркавирусы (класс IV а)**

Вирусы этого подкласса, из которых наиболее интенсивно изучался вирус полиомиелита, известны под общим названием “пикоркавирусы”. К их числу относятся также вирус менго, вирус энцефаломиокардита (пикоркавирусы мышей), риновирусы (вирусы, вызывающие у человека один из видов острых респираторных заболеваний, - так называемую простуду\_ и вирус ящура.

Тогавирусы (класс IV в)

К тогавирусам относятся все плюс - РНК-вирусы, в которых образуются м РНК двух типов, различающиеся по своим размерам. Название “тогавирусы” отражает особенности внешней оболочки их вирионов. Синтез этой оболочки рассматривается в другом разделе, а здесь мы обсудим только механизмы синтеза РНК и белков, используемые вирусами данного класса. Прежде чем перейти к рассмотрению молекулярной биологии тогавирусов, интересно вспомнить, как были обнаружены вирусы этой группы. Эпидемиологи установили, что многие вирусы, вызывающие заболевания позвоночных животных, переносятся клещами или комарами.

Тогавирусы, патогенные для человека, обычно эндемичны для различных видов животных и передаются человеку лишь через укус какого-либо членистоногого переносчика. Вирусы этой группы были названы арбовирусами (означает “переносимый членистоногими”). Впоследствии, однако, стало ясно, что под этим названием объединены вирусы, резко различающиеся по своим биохимическим свойствам. Общим у них обычно является способность размножаться как в клетках насекомого-переносчика, так и в клетках тех или иных позвоночных животных. Основная часть арбовирусов по своим биохимическим свойствам относится к тогавирусам. Серологически тогавирусы делятся на две группы (А и В), которые в настоящее время называются альфавирусами и флавирусами соответственно. К числу тогавирусов относятся по меньшей мере два вируса, не являющиеся арбовирусами, - вирус краснухи и вирус, повышающий в крови зараженного им животного содержание лактатдегидрогеназы..

**Вирусы, содержащие минус - цепь РНК (класс V):**

**вирус везикулярного стоматита**

Минус - РНК-вирусы подразделяются на три главные морфологические категории: рабдовирусы, парамиксовирусы и ортомиксовирусы. В плане биохимической стратегии рабдовирусы и парамиксовирусы очень близки друг к другу и составляют большую часть хорошо изученных вирусов класса Vа. В данном разделе основное внимание будет уделено только одному рабдовирусу - вирусу везикулярного стоматита (ВВС), так как он изучен наиболее детально. Хотя ВВС и патогенен для крупного рогатого скота, вызываемые им заболевания протекают легко и не приводят к серьезным экономическим убыткам. В культурах клеток ВВС размножается быстро и урожай его достигает высоких титров. Зараженные им клетки погибают. При заражении чувствительных клеток другими рабдовирусами или парамиксивирусами обычо развивается персистентная инфекция, не приводящая к гибели клеток. Поэтому такие системы вирус-клетка намного труднее поддаются изучению. Ортомиксовирусы, из которых наиболее известными являются вирусы гриппа человека, имеют сегментированным геном, состоящий из ряда отдельных минус-цепей РНК.

Вирион ВВС, подобно вирионам всех других тогавирусов, покрыт внешней оболочкой, но в отличие от них имеет характерную форму пули. Само название “рабдовирусы” происходит от греческого корня, означающего “палочка”, и обусловлено асимметричностью этих частиц. Пулеобразная форма вириона отражает форму его нуклеокапсида, предоставляющего собой свернутую в цилиндр спираль и содержащего одну молекулу РНК с мол. Весом 4.106. Эта РНК не обладает ни одним из характерных признаков м РНК вирусов эукариот: на ее 3-м конце нет последовательности poly (А), а на 5-м конце нет “шапочки”. Кроме того, она не обладает инфекционностью. Ее функция состоит в том, что она служит мартицей для синтеза вирусных м РНК и, следовательно, является минус - цепью РНК. Нуклеокапсид ВВС представляет собой очень стабильную структуру, и находящаяся в нем РНК полностью защищена от действия рибонуклеазы. Нуклеокапсид этого вируса инфекционен, но его удельная инфекционность очень мала. Вирион ВВС содержит пять различных белков, и других вирусных белков в зараженных клетках не обнаруживается. Белок, на долю которого приходится основная масса белков нуклеокапсида и вириона в целом, называется белком N. Нуклеокапсид содержит небольшое количество еще двух белков, называемых белками L и № 9. Они принимают участие в синтезе вирусной РНК. Пространство между нуклеокапсидом и липопротеидной оболочкой вириона заполнено молекулами еще одного вирусного белка, называемого белком М. Наконец , снаружи от двойного слоя липидов оболочки находится белок G, образующий упорядоченную систему расположенных на поверхности вириона шипов.

В отличие от рабдовирусов парамиксовирусы не имеют пулеобразной формы, а представляют собой неправильные сферы, что отражает менее упорядоченную укладку их нуклеокапсидов.

**Внешние оболочки вирусов**

Общим свойством тогавирусов, минус-РНК-вирусов и ретровирусов является наличие у них липопротеидной внешней оболочки, окружающей рибонуклеопротеидную сердцевину. Механизм образования такой оболочки у всех вирусов один и тот же: рибонуклеопротеид связывается с внутренней поверхностью измененного участка плазматической мембраны клетки и при выходе из клетки окружается этой измененной мембраной. Такой процесс называется почкованием, а образующаяся вирусная частица в тот период, когда она еще связана с плазматической мембраной, носит название почки. На электронных микрофотографиях ультратонких срезов клеток эти почки очень хорошо видны, ибо они представляют собой характерно измененные оболочки плазматической мембраны.

**Строение вириона**

В состав вирионов, имеющих внешнюю оболочку, входят три главных класса структурных белков: глинопротеиды, белки матрикса и белки нуклеокапсида. Макроструктура вириона определяется свойствами поверхности двойного слоя липидов, окружающего нуклеокапсид. Наружная поверхность двойного липидного слоя покрыта гликопротеидом, а внутренняя контактирует с белками матрикса или нуклеокапсида. Все липиды, содержащиеся во внешней оболочке вириона, имеют клеточное происхождение, так как не обнаружено какого-либо вирус-специфического обмена липидов. По своему составу липиды вириона очень сходны с липидами плазматической мембраны клетки-хозяина: в их число входят холестерин, гликолипиды и фосфолипиды. Клетки различных видов существенно различаются между собой по липидным компонентам плазматических мембран. Поэтому липидный состав вируса, формирующегося в данной клетке, точно соответствует липидному составу ее плазматической мембраны.

Гликопротеиды, содержащиеся в оболочках различных вирусов, обладают как специфическими свойствами, так и свойствами, общими для всех вирусных гликопротеидов. Все они находятся на внешней поверхности вириона и могут быть удалены под воздействием протеаз. Поскольку протеазы отщепляют от интактных вирионов только гликопротеиды, ясно, что наружу из двойного слоя липидов выступают лишь эти молекулы вирусных белков. Следует отметить, что протеазы удаляют лишь часть молекулы гликопротеида. Другая ее часть - “ножка”, состоящая из высокогидрафобного полипептиада - по-видимому, погружена в двойной липидный слой и недоступна для протеазы.

**Сборка вириона**

На первой стадии формирования вириона происходит синтез его индивидуальных белков. Белки каждого из трех классов синтезируются, по-видимому, независимо друг от друга и часто на отдельных м РНК.

Гликопротеиды образуются на связанных с мембранами м РНК и в свободном состоянии в клетках никогда не встречаются. Молекулы белка “созревают” по мере их передвижения из шероховатого эндоплазматического ретикулума в гладкий, а затем, возможно, в аппарат Гольджи и, наконец, в плазматическую мембрану клетки. Присоединение углеводов к белкам происходит при перемещении последних по внутриклеточным мембранам. В конце концов они выходят на поверхность клетки, где, вероятно, свободно плавают в жидком двойном липидном слое плазматической мембраны.

**Вирусы, содержащие двухцепочечную РНК (класс III)**

Вирусы данного класса были обнаружены у плесеней, высший растений, насекомых и позвоночных животных. Ни один из этих вирусов не содержит липидов. Их капсиды состоят из двух слоев - внутреннего (сердцевины) и наружного, образующего оболочку вокруг сердцевины. В сердцевине находится множество сегментов двухцепочечной РНК и варьирующее число небольших олигонуклеотидов, не имеющих, по-видимому, никаких генетических функций. Наиболее тщательно изучены реовирусы человека, которые, как правило, не вызывают каких-либо явных патологических симптомов. Исключение составляют, по-видимому, реовирусоподобные агенты, выделяемые при гастроэнтеритах у детей. Тем не менее эти вирусы часто выделяют из организма человека, причем в лабораторных условиях они хорошо размножаются. Некоторые данные получены также об отдельных вирусах растений и насекомых, содержащих двухцепочечную РНК.

**Размножение вирусов животных.**

**ДНК-содержащие вирусы и ретровирусы.**

Поскольку в нормальных клетках нет никаких эквивалентов генетических систем РНК-содержащих вирусов, такие вирусы способны размножаться лишь в том случае, если они синтезируют ферменты, необходимые для транскрипции и репликации их генома. В случае ДНК-содержащих вирусов, напротив, синтез их м РНК происходит так же, как и м РНК нормальных клеток. Репликация их генома и генома клетки формально также весьма сходны. Более того, транскрипция и репликация ДНК большинства вирусов, так же как и клеточной ДНК происходит в ядре. Сходство основных процессов у клеток и ДНК-вирусов наводит на мысль, что для размножения последних нет никакой необходимости в индукции каких-то особых ферментов, отсутствующих в незараженной клетке. Отсюда следует, что для размножения ДНК-вируса достаточно присутствия белков его капсида, так что геном такого вируса вполне может состоять только из генов, кодирующих его капсид. Следует, однако, подчеркнуть, что, хотя такие простые ДНК-вирусы действительно существуют, жизненный цикл большинства ДНК-вирусов значительно сложнее. Различные ДНК-вирусы очень сильно отличаются друг от друга как по величине, так и по сложности их строения. Молекулярный вес ДНК наименьших из них составляет всего 1,5х106 дальтон, а самых крупных - в 100 раз больше. По мере увеличения вирусных геномов они становятся все сложнее и сложнее. Возрастает общее число генов и усложняется механизм репликации ДНК.

Поскольку мелкие ДНК-вирусы способны к интенсивному размножению, представляется удивительным сам факт возникновения крупных ДНК-вирусов. Одно из преимуществ, которое может получить вирус при увеличении его генома - это уменьшение зависимости от клетки.

**Парвовирусы**

Самыми простыми из всех известных вирусов, вероятно, являются парвовирусы. Их геном представлен одноцепочечной ДНК с мол. Весом всего 1,5х106 дальтон. Однако для единственного кодируемого этим вирусом продукта - белка его капсида - даже эта малая молекула слишком велика. Размножение этого крошечного паразита, по-видимому, действительно полностью зависит от соответствующих систем клетки-хозяина. Существует два основных класса парвовирусов - автономные и дефектные. Все до сих пор известные автономные парвовирусы - это вирусы грызунов; для транскрипции, репликации и других функций эти вирусы используют соответствующие ферменты клетки-хозяина. Дефектные парвовирусы размножаются лишь в клетках, которые заражены одновременно аденовирусом, выполняющим некоторые необходимые функции. До сих пор не найдено нормальных клеток, в которых могли бы размножаться дефектные парвовирусы. В клетках, находящихся в стационарной фазе, автономные парвовирусы не размножаются, они размножаются лишь в клетках ДНК которых уже реплицируется, т.е. в клетках, находящихся в S-фазе клеточного цикла.

Это ограничение касается типа клеток, поражаемых данными вирусами. Парвовирусы вызывают аномалии развития у эмбрионов и дефекты растущих тканей у новорожденных. Они вызывают также нарушения функции кишечника, что, вероятно, является следствием их размножения в быстро делящихся клетках крипт.

Дефектные парвовирусы размножаются только в клетках, зараженных аденовирусом - помощником, и не зависят от фазы клеточного цикла. Их вирусом- помощником могут быть только аденовирусы. Герпесвирусы также способны выполнять некоторые из необходимых функций вируса - помощника, однако полные инфекционные частицы парвовирусов в этом случае не образуются. Именно по этой причине дефектные парвовирусы называют также “аденоассоциированными” вирусами (ААВ).

Одно из характерных различий между автономными и дефектными парвовирусами состоит в том, что геном первых представлен уникальной одиночной цепью ДНК, а геном дефектных парвовирусов - эквимолярными количествами одноцепочечных комплелянтарных друг другу молекул ДНК. При гибридизации одноцепочечные молекулы ДНК, выделенные из вирионов ААВ, легко превращаются в молекулы двухцепочечных ДНК. Вирионы парвовирусов близки по величине к рибососмам - их диаметр 20 нм. Не содержащие липидов капсиды этих вирусов состоят из трех полипептидов различной длины. Молекулярный вес самого большого из них 90000 дальтон. Судя по пептидной карте, малые полипептиды представляют собой части большого; поэтому полагают, что вирусная м РНК кодирует только полипептид с мол. весом 90000.

**Паповавирусы**

Паповавирусы известны лучше других благодаря принадлежащим к этой группе подробно исследованным онкогенным вирусам - вирусу полиомы и SV40, которые размножаются лишь в очень узком кругу клеток млекопитающих. Обычно при изучении онкогенных свойств этих вирусов, имеется в виду их способность трансформировать клетки in vitro - ими заражают клетки тех видов, которые они трансформируют, но в которых не размножаются, а следовательно, и не вызывают их лизис.

В состав группы паповавирусов, кроме вирусов полиомы и SV40, входит ряд других вирусов. Свое наименование паповавирусы - группа получила от названий трех вирусов: вируса кроличьей папилломы, вируса полиомы (по) и вакуолизирующего (ва) обезъянеьего вируса, тип 40 (SV40). У человека эти вирусы не вызывают заболеваний, хотя SV40 иногда заражает клетки человека. У людей широко распространены три других паповавируса - вирус JC, ВК и вирус бородавок. Предполагается, что вирус JC является этиологическим агентом прогрессирующего дегенеративного заболевания центральной нервной системы человека. Вирус ВК часто обнаруживают в моче лиц, принимавших иммунадепрессанты, однако пока его не связывают с какой-либо патологией у человека. Вирус бородавок человека, как и вирусы папиллом животных, вызывает лишь доброкачественную пролиферацию эпидермиса.

Вирусы паполломы плохо размножаются в клеточных культурах, поэтому до сих пор изучены в основном, лишь их физические свойства. Установлено, что их ДНК несколько крупнее, чем ДНК вирусов SV40 и полиомы.

**Аденовирусы**

Хотя в вирионах аденовирусов содержится в 608 раз больше ДНК, чем в паповавирусах, и геном аденовирусов кодирует соответственно большее число белков, циклы репродукции этих вирусов в основном сходны. Так, у аденовирусов, как и у паповавирусов, имеется механизм, контролирующий переключение синтеза ранних макромолекул на синтез поздних, а их м РНК. Также считываются с обеих цепей вирусной ДНК. Однако ДНК аденовирусов - линейная молекула, и поэтому механизм ее репликации должен отличаться от механизма репликации ДНК паповавирусов. В отличие от ДНК паповавирусов частота рекомбинации ДНК аденовирусов достаточно велика, благодаря чему последние можно изучать и методами формальной генетики.

**Разнообразие аденовирусов**

Аденовирусы выделены от самых разнообразных видов животных. Более того, от каждого из этих видов выделено много различных аденовирусов. Так, среди аденовирусов человека идентифицирован 31 серологический тип. Однако в молекулярно-биологическом аспекте аденовирусы весьма сходны, поэтому при дальнейшем обсуждении мы не будем проводить между ними различий. Аденовирусы в основном вызывают острые респираторные заболевания; некоторые серотипы аденовирусов человека при введении хомячкам вызывают у них опухоли. Почти все штаммы аденовирусов способны вызывать трансформацию фибробластов крысы в культуре, но ни один из этих вирусов не имеет отношения к злокачественным опухолям у человека. Из сказанного ясно, что аденовирусы представляют интерес и как инфекционные агенты, вызывающие респираторные заболевания у человека, и как вирусы, способные вызывать опухоли, и как объекты молекулярно-биологических исследований.

Вирионы аденовирусов отличаются изяществом структуры. В синтезе вирусных частиц участвуют 14 видов белков, а быть может, и больше. В это число входят и белки, из которых построены компоненты поверхности вириона - гексоны, пентоны и фибриллы.

**Герпесвирусы**

Герпесивирусы, столь различные по характеру репродукции, но весьма сходные морфологически и по содержанию ДНК, составляют часть биохимически гомогенной группы. Наиболее детально изучены герпесвирусы, вызывающие лизис зараженных клеток . К их числу относятся вирусы простого герпеса, типы 1 и 2 и ряд быстро размножающихся герпесвирусов животных. Из вирусов этой группы, не вызывающих лизиса, наиболее изучен вирус Эпштейна-Барр, вызывающий инфекционный мононуклеоз - этот вирус постоянно выделяют из клеток двух видов опухолей человека - лимфомы Беркитта и карциномы носоглотки. В отличие от вирусов простого герпеса типов 1 и 2, размножающихся в культурах многих клеток и вызывающих лизис, вирус Эпштейна-Барр заражает только В-лимфоциты приматов и размножается не во всех из них.

ДНК герпесвирусов кодирует не менее 49 различных белков, для синтеза которых используется почти вся кодирующая способность вирусного генома. Изучение физиологии столь сложной системы - задача далеко не легкая.

**Поксвирусы**

У всех ДНК-содержащих вирусов, о которых речь шла выше, ДНК синтезируется в ядре зараженной клетки, там же и созревают их вирионы. Все стадии размножения поксвирусов происходят только в цитоплазме. Следовательно, репродукция поксвирусов происходит в совершенно иных условиях по сравнению с “ядерными” ДНК-содержащими вирусами. Известно большое разнообразие поксвирусов. Наиболее важным из них для человека является вирус натуральной оспы. Однако наиболее детально изучен вирус осповакцины и родственные ему вирусы кроличьей оспы и коровьей оспы. Все поксвирусы имеют общий антиген.

**Автономность размножения поксвирусов**

Электронная микроскопия зараженных клеток показывает, что процесс размножения поксвирусов ограничен цитоплазмой. Наиболее убедительно об этом свидетельствует тот факт, что почти весь цикл размножения вирусов этой группы может реализоваться в клетках, которые в результате воздействия на них цитохалазина В лишены ядра. Заражение таких фрагментов приводит к синтезу в них вирусной ДНК и многих вирусных белков: вирионы же в безъядерных клетках не синтезируются. Следовательно, поксвирусы переносят центр функциональной активности клетки из ядра в цитоплазму. Можно ожидать, что для этого вирус должен обладать обширной специфической информацией, и поксвирусы действительно такой информацией обладают, что выражается в числе кодируемых и синтезируемых ими белков. В полном соответствии с этим является то, что молекулярный вес ДНК таких вирусов больше, чем у любого другого вируса животных, и что репродукция данного вируса связана с инициацией активности самых разнообразных ферментов. Размножаясь в цитоплазме, поксвирусы во многом ближе к РНК-вирусам, чем к “ядерным” ДНК-вирусам. И действительно, подобно некоторым РНК-вирусам, размножение поксвирусов как таковое начинается с транскрипции ДНК вириона РНК-полимеразой, содержащейся в самом вирионе, вирион содержит все ферменты, необходимые для превращения РНК-предшественника в функционально активные м РНК.

**Ретровирусы**

Ретровирусы обладают свойствами как РНК, так и ДНК-содержащих вирусов. В вирионе ретровирусов содержится РНК, однако внутри клетки они существуют в виде ДНК, интегрированной с геномом клетки-хозяина. По существу, РНК этих вирусов, проникая в клетку, превращается в ее гены, которые могут передаваться потомкам в виде стабильных интегрированных молекул ДНК. ДНК-вирусов, которые наследовались бы подобным образом, не обнаружено, так как все ДНК- содержащие вирусы вызывают продуктивную инфекцию и убивают клетки, в которых они размножаются. Включаться в геном клетки-хозяина ДНК-содержащие вирусы могут только в случаях “непродуктивных” вирусных инфекций. Ретровирусы, напротив, размножаясь путем почкования, подобно многим другим РНК- вирусам, поддерживают продуктивную инфекцию, не вызывая гибели клетки-хозяина. Из сказанного ясно, что центральная проблема, без решения которой нельзя понять механизм репродукции этих вирусов, состоит в том, каким образом они превращаются из РНК-вирусов в ДНК-гены; этот процесс был назван обратной транскрипцией, ибо здесь направление потока биологической информации изменено на обратное.

Обнаружено много самых разнообразных ретровирусов. Некоторые из них способны вызывать злокачественные опухоли. Лучше других изучены вирус саркомы Рауса и вирусы, вызывающие лейкозы у кур и мышей. Из всех известных РНК-содержащих вирусов злокачественные опухоли могут вызвать только ретровирусы. Именно поэтому их принято называть общим термином “опухолеродные РНК-вирусы”, хотя многие ретровирусы не вызывают ни злокачественных, ни каких-либо иных клинически выраженных заболеваний. Поэтому в единую классификационную группу их объединяет лишь способ репродукции. Подобно другим группа вирусов, различные виды ретровирусов также отличаются друг от друга по размеру и морфологическим особенностям вирионов, числу белков, а также по кругу чувствительных хозяев.

**Влияние вирусной инфекции на клеточном уровне**

Различают три вида воздействий, оказываемых вирусами животных на клетки. Легче всего выявляется деструктивный, или цитолитический, эффект, для которого характерно обширное повреждение множества различных клеточных органелл. Вероятно, вирус - специфические макромолекулы вызывают первичное повреждение, влекущее за собой цепь вторичных деструктивных процессов, в которых участвуют уже продукты метаболизма самой клетки. На другом конце спектра возможных последствий находится явление трансформации, когда зараженная вирусом клетка приобретает способность к неограниченному делению. По-видимому, это результат устойчивой интеграции вирусного генома или его части с геномом клетки, которая не приводит к ее гибели. Трансформированная клетка часто выходит из-под контроля механизмов, регулирующих клеточное деление. Действие некоторых вирусов, геном которых не включается в хромосомы клеток, занимает промежуточное положение между резко выраженным деструктивным эффектом и трансформирующим действием. В этих случаях зараженные клетки еще некоторое время функционируют и по меньшей мере в одном случае - при заражении парамиксовирусами - продолжают расти и делиться, одновременно продуцируя вирус (“персистентная инфекция”). Возможна еще одна категория реакции клеток, при которой можно говорить об индуктивном действии вируса. Многие вирусы способны индуцировать образование в зараженной клетке белков, кодируемых не вирусным, а клеточным геномом, но, по-видимому, синтезируемых клетками в ответ на вирусную инфекцию. Этот тип реакции не обязательно связан с тем или иным конечным результатом взаимодействия вируса с клеткой.

Цитолическое действие вирусов: биохимические данные.

Зная, что многие вирусы вызывают резкие деструктивные изменения клеток-хозяев, биохимики заинтересовались вопросом, прекращается ли при этом синтез всех клеточных белков РНК и ДНК, и если да, то в какой последовательности. Ответы сводятся к следующему:

Вероятно, различные вирусы подавляют синтез клеточных белков, используя разные механизмы. Степень и время этого подавления тоже неодинаковы.

Нередко вирус блокирует накопление клеточной РНК, приостанавливая процессинг пре-р РНК, но никак не влияя на ее синтез. Образование клеточной т РНК часто не снижается. Во многих случаях бывает нарушен синтез клеточных м РНК, но механизм этого нарушения совершенно неясен.

Нередко бывает подавлена инициация синтеза клеточной ДНК, однако при некоторых вирусных инфекциях клетки, уже вошедшие в фазу S, могут завершить цикл синтеза ДНК, а клетки, прошедшие через фазу S, могут пройти и через митоз. Ингибирование синтеза клеточной ДНК- это вероятно, вторичное следствие прекращение синтеза белка, так как синтез ДНК идет лишь в том случае, если одновременно продолжается синтез белка.

**Интерферон**

Рассматривая здесь интерферон только как белок, синтезируемый клеткой в ответ на вирусную инфекцию и придающий устойчивость к инфекции другим клеткам, это значило бы игнорировать историю открытия интерферона и связь его с давно известным явлением интерференции вирусов.

Уже давно было известно, что животное часто приобретает защиту от вирулентного действия одного вируса в результате одновременного или предшествующего заражения менее вирулентным штаммом того же вируса или каким-либо другим, неродственным вирусом. Впервые это явление было подвергнуто количественному анализу при изучении тормозящего действия ненейротропных штаммов вируса гриппа на размножение нейратропного штамма. Такое действие оказывает не только живой вирус: образование инфекционного вируса гриппа в куриных эмбрионах вирусом гриппа, облученным ультрафиолетом.

Айзекс и Линдеман обнаружили, что аллантоисная жидкость куриных эмбрионов, в которые был введен облученный вирус, тоже обладает интерферирующей активностью. Вещество, ответственное за эту активность, было названо интерфероном. Оно блокирует репродукцию самых различных РНК- и ДНК- вирусов как в куриных эмбрионах, так и в культурах клеток. Интерферон образуется и в организме многих животных. Это также синтезирует in vitro клетки самых различных типов, как нормальные, так и злокачественные, хотя и в весьма разных количествах. Особенно хорошими продуцентами интерферона могут служить клетки Lмыши и специально выведенная линия фибробластов человека. Большие количества интерферона вырабатывают также циркулирующее в крови лейкоциты. Наконец, некоторые ткани, по-видимому, накапливают интерферон, так как введение в организм различных неспецифических токсичных веществ, например бактериального эндотоксина, быстро приводит к появлению в сыворотке крови больших количеств вещества, тормозящего размножение вирусов - скорее всего интерферона.

Одно время полагали, что интерфероны строго водоспецифичны, однако это неверно. Например, интерфероны человека и обезьяны защищают от вирусов как клетки человека, так и клетки обезьян, позднее было обнаружено, что это относится и к интерферонам более далеких друг от друга видов, например человека и различных грызунов. Однако эффективность гетерологичных интерферонов сильно варьирует.

Степень защиты того или иного вируса определяется типом клеток, а не интерферона. Интерферон человека защищает клетки человека от вируса везикулярного стоматита лучше, чем от вируса леса Семлики, и такое же соотношение наблюдается при защите клеток человека интерфероном обезьяны. Напротив, клетки обезьяны получают большую защиту от второго из этих вирусов, чем от первого, независимо от того, какой из двух интерферонов к ним добавляют.

Интерферон - очень активный белок. Человеческий интерферон уже в концентрации 10-11 М препятствует размножению вируса везикулярного стоматита в фибробластах человека. Для сравнения напомним, что полипептидные гормоны, например инсулин, глюкагон и другие, физиологически активны в концентрациях от 5х10-10 до 1х10-8 М.

Даже без полной очистки интерферона можно продемонстрировать его гетерогенность. Интерфероны, продуцируемые клетками одного вида, например человека, могут защищать от вирусов клетки других, весьма отдаленных видов, например кролика. Стюарт и Десмайтер определили молекулярный вес интерферона человеческих лейкоцитов, защищавшего от вирусов клетки как человека, так и кролика. В неочищенных препаратах они обнаружили два вида активных молекул с мол. Весами около 21000 и 15000 соответственно. Активность меньше молекул в отношении клеток человека оказалась в 20 раз большей, чем в отношении клеток кролика, тогда как более крупные молекулы были в обоих случаях одинаково активны. Кроме того, интерферон с мол. Весом 15000 полностью инактивировался под действием В-меркаптоэтанола, который разрывает дисульфидные мостики, а активность интерферона с мол. Весом 21000 не изменялась. Таким образом многие клетки (если не большинство их) продуцируют два вида полипептидов, обладающих активностью интерферона. Индукция синтеза интерферона и индукция интерфероном “противовирусного” состояния клетки - два тесно связанных между собой, но, вероятно различных явления. Клетки, приобретающие устойчивость к вирусам, могут продуцировать интерферон. Однако за устойчивость клеток почти наверняка ответствен не сам интерферон, а какой-то другой белок, ибо от момента добавления интерферона до полного развития у них устойчивости к вирусам проходит много часов, и после этого клетки могут и не продуцировать обнаружимых количеств интерферона. Тем не менее добавление вируса к клеткам, защищенным с помощью интерферона, может привести к дополнительной выработке интерферона этими клетками.

**Индукция интерфероном устойчивости клеток к вирусам**

Клетки в культуре in vitro , в которых синтез интерферона индуцирован убитым вирусом или полинуклеотидами, также становятся устойчивыми к вирусам. Кроме того, многие клетки, подвергшиеся воздействию интерферона, при заражении их вирусом вырабатывают очень большие добавочные количества этого вещества. Однако некоторые клетки обезьян хотя и становятся устойчивыми к вирусам после воздействия интерферона обезьяны, не могут вырабатывать обнаружимых количеств интерферона и не приобретают устойчивости к вирусам после воздействия poly (е) poly (с) и других двухцепочечных РНК. Кроме того, клетки этой линии в отличие от большинства других почечных клеток обезьян после заражения их вирусом краснухи не становятся устойчивыми по многим другим вирусам. Показано также , что в тех случаях, когда индукция интерферона при помощи poly(е) poly (с) сочетается с добавлением к культуре анти-интерфероновых антител, клетки не становятся устойчивыми к вирусной инфекции.

Все этим данные позволяют предполагать, что для создания устойчивости к вирусам нужно, чтобы на поверхности клетки оказались небольшие количества интерферона. Возможно, что при индукции устойчивости с помощью poly (е) poly (с) вначале образуется интерферон, а затем уже этот интерферон индуцирует состояние устойчивости. Однако после того как это состояние полностью сформировалось, образования клетками интерферона обнаружить не удается и если не прибавляют снова интерферон, устойчивость исчезает. Результаты ряда других экспериментов также подкрепляют гипотезу о том, что интерферон индуцирует устойчивость клеток к вирусам, взаимодействуя с клеточной мембраной.

Молекулярная основа устойчивости клеток к вирусам.

Хотя устойчивость, индуциорованная интерфероном, защищает клетки от самых различных ДНК РНК-вирусов, степень защиты от разных вирусов неодинакова. Кроме того, для достижения сходной степени защиты клеток одной и той же культуры от различных вирусов нужны различные количества интерферона. Миксовирусы, тогавирусы и вирус осповакцины, у которых имеется оболочка, содержащая липиды, более чувствительны к действию интерферона, чем аденовирусы и энтеровирусы. Однако ряд вирусов, обладающих оболочкой, в том числе вирусы герпеса и ньюкаслской болезни, более устойчивы к интерферону. Наиболее устойчивы мелкие РНК-содержание икосаэдрические вирусы. Интерферон блокирует вирусную инфекцию после адсорбции вируса и проникновения его в клетку. Поскольку интерферон может подавлять репликацию как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов, логично предположить, что он ингибирует трансляцию вирусных м РНК на рибосомах клетки - процесс, общий для всех вирусов. Такого рода эффект мог бы реализоваться при участии противовирусного белка, способного отличать клеточные м РНК от вирусных. Однако при изучении синтеза белка в экстрактах клеток, обработанных интерфероном, не было получено убедительных данных о том, что такие системы нормально транслируют клеточные м РНК, но не транслируют вирусных м РНК. Таким образом, несмотря на привлекательность простейшей гипотезы, объясняющей действие интерферона избирательным подавлением трансляции вирусных м РНК, нужно признать, что ни один простой механизм не согласуется со всеми известными данными об устойчивости клеток к вирусной инфекции.

В клетках, подвергшихся действию интерферона, а затем зараженных вирусом осповакцины, синтез “ранних” м РНК вирионной ДНК-зависимой РНК-полимеразой не подавляется, но эти м РНК не транслируются и синтеза ранних вирусных белков не происходит. При заражении клеток реовирусами большие количества интерферона тоже лишь очень незначительно подавляют синтез вирусных м РНК и намного сильнее ингибируют их трансляцию Однако ни в том, ни в другом случае не было показано, что вирусные м РНК подвергались надлежащей модификации - что к 3-концу присоединялась метилированная “шапочка” или (в случае вируса осповакцины) к 3-концу добавлялась цепочка poly (А). Поэтому возможность, что индуцированная устойчивость к вирусам связана не с изменением аппарата трансляции, а с образованием неполноценных вирусных м РНК.

**Интерференция вирусов без участия интерферона**

Некоторые вирусные инфекции исключают возможность последующего размножения в тех же клетках других неродственных, а в некоторых случаях и родственных вирусов. Это явление было названо интерференцией. В отличие от действия интерферона оно связано не с реакцией генома клетки на вирусную инфекцию, а с тем, что первый вирус образует в клетке специфические продукты, препятствующие размножению в той же клетке другого вируса. Было исследовано множество парных сочетаний различных вирусов: вероятно, в большинстве случаев интерференция обусловлена блокадой трансляции м РНК второго вируса. Однако в некоторых случаях первый вирус блокирует способность второго надлежащим образом проникать через плазматическую мембрану клетки.

**Разнообразие возбудителей и вызываемых ими заболеваний**

Ни одна из попыток построить простую систему классификации патогенных вирусов пока не увенчалась успехом. Нет такого клинического синдрома, который мог бы быть вызван вирусом только одного типа, и нет такой группы вирусов, которая поражала бы только одну определенную ткань. Например, легко протекающие заболевания верхних дыхательных путей могут быть вызваны пикорнавирусами (риновирусами, вызывающими так называемые простудные заболевания), аденовирусами, миксовирусами (вирусом гриппа) парамиксовирусами (респираторно-синцитиальным вирусом) и, вероятно, другими, например реовирусами, обладающими оболочкой, - короновирусами. Печень могут поражать тогавирусы (например, вирус желтой лихорадки) и вирус гепатита (он, вероятно, содержит ДНК и липиды). Заболевания нервной системы, приводящие к параличам и смерти, могут вызвать тогавирусы )к этой группе относятся десятки различных возбудителей энцефалита), рабдовирусы (например, вирус бешенства), пикорнавирусы (вирус полиомиелита) и ряда других. К системным вирусным болезням, сопровождающимся обильными кожными высыпаниями, относятся оспа - едва ли не самая грозная из вирусных инфекций и такие распространенные и легкие болезни, как корь, ветряная оспа, краснуха. Вирус оспы, который еще недавно губил множество людей в развивающихся странах, является типичным представителем группы поксвирусов.

Вирус кори - возбудитель быстро проходящего заболевания, при котором, однако иногда поражается и центральная нервная система - относится к парамиксовирусам, а вирус краснухи, обычно легкого заболевания, проявляющегося в основном сыпью, - к тогавирусам. Болезнь, называемая “ветряной оспой” на самом деле вызывается герпесвирусом, совсем не родственным вирусу оспы. Этол в высшей степени контагиозный вирус, почти неизменно вызывающий клинически явно выраженное заболевание.

**Персистентные инфекции**

Большинство упомянутых выше вирусных инфекций приводит к развитию соответствующих симптомов в течение нескольких дней или максимум двух-трех недель. Заболевания эти острые, т.е. начинаются они более или менее внезапно и длятся определенное, достаточно короткое время. Однако во многих других случаях вирусы весьма долго взаимодействуют с организмом животного или человека. Различают следующие формы таких инфекций:

латентные инфекции, при которых содержащийся в организме вирус лишь время от времени вызывает характерные поражения, вскоре исчезающие сами собой. Из пораженных участков можно выделить вирус, но потом он становится “латентным”, т.е. его уже выделить не удается.

хронические инфекции - длительно протекающие заболевания, при которых вирус присутствует постоянно. Симптомы могут полностью отсутствовать или же могут вызываться комплексами вирус-антитело либо взаимодействием противовирусных антител с зараженными клетками, вероятнее всего с их мембранами.

медленные инфекции - медленно прогрессирующие заразные заболевания с исключительно длинным латентным периодом.

**Иммунные реакции**

Наиболее специфическая реакция на вирусную инфекцию - это, конечно, выработка антител. Циркулирующие антитела, по-видимому, играют важную роль в предупреждении некоторых вирусных инфекций. Например, как после заболеваний, вызываемых многими вирусами, так и после вакцинации наблюдается длительный иммунитет и в сыворотке крови выявляются специфические антитела. Циркулирующие антитела при ряде вирусных инфекций, вероятно, служат барьером, препятствующим распространению вируса по всему организму. На это указывает тот факт, что при кори и свинке раннее введение глобулина блокирует дальнейшее развитие болезни. Вероятно, при естественно протекающих заболеваниях быстрое появление антител в крови может препятствовать распространению вируса из первичного очага инфекций. После инъекции кроликам вируса полиомиелита уже через 24 часа с помощью достаточно чувствительного метода в сыворотке можно обнаружить антитела к этому вирусу. Поэтому вполне возможно, что именно такие ранние антитела ответственны за тот факт, что у человека размножение этого вируса в глотке и кишечнике в большинстве случаев не ведет к его распространению по всему организму. Как полагают по той же причине немедленная вакцинация укушенного больным животным человека защищает его центральную нервную систему от поражения вирусом бешенства.

**Опухолеродные вирусы**

За годы, прошедшие с тех пор, как впервые был установлен факт возникновения вирусных сарком у кур, многочисленными исследователями у разных видов позвоночных были обнаружены онкогенные вирусы, принадлежащие к двум группам : ДНК - содержащие и ретровирусы. Среди онкогенных ДНК-вирусов есть паковавирусы, адековирусы и герпесвирусы. Из РНК-содержащих вирусов опухоли вызывают только ретровирусы.

Диапазон опухолей, вызываемых онкогенными вирусами, необычайно широк. Хотя вирус полиомы вызывает главным образом опухоли слюнных желез, уже само его название показывает, что он способен вызывать и многие другие опухоли. Ретровирусы вызывают главным образом лейкозы и саркомы, которые нередко бывают причиной опухолей молочной железы и ряда других органов. Хотя рак - это заболевание целого организма, аналогичное по сути явление, называемое трансформацией, наблюдается и в культурах клеток. Такие системы используются в качестве моделей для изучения онкогенных вирусов. Способность трансформировать клетки in vitro лежит в основе методов количественного определения многих онкогенных вирусов. Эти же системы используются и для сравнительного изучения физиологии нормальных и опухолевых клеток.

**Что такое трансформированная клетка ?**

Один из способов получения популяции трансформированных клеток состоит в заражении нормальных клеток онкогенным вирусом, например вирусом саркомы Рауса или вирусом полиомы, и последующем выделении колоний измененных клеток. Изменения могут касаться морфологии клеток (например, их округление) и характера роста (“наползание” клеток друг на друга в отличие от нормального роста в виде однослойной культуры или приобретение способности размножаться в полужидкой среде, в которой нормальные клетки не размножаются).

Существуют и иные критерии отбора трансформированных клеток. Как правило, клетки отобранные по одному из критериев, удовлетворяют и большинству других. Способностью трансформировать клетки in vitro обладает большинство онкогенных ДНК-вирусов и вызывающих саркомы ретровирусов. Ретровирусы, вызывающие лейкозы, напротив, размножаются в клетках, не вызывая их трансформации. Получив культуру клеток, признанных трансформированными по одному из упомянутых критериев, следует сопоставить их с нормальными клетками по ряду других параметров. Во многих книгах такого рода перечислены те изменения свойств клеток, которые происходят в процессе трансформации. Известны две большие группы изменений :

1) изменения регуляции роста и продолжительности жизни, и

изменения клеточной поверхности (плазматической мембраны).

**Изменения свойств клеток, определяющие рост и размножение.**

Большинство нормальных клеток, размножаясь, прикрепляются к субстрату (к стеклянной или пластмассовой стенке сосуда). Нормальные клетки перестают делиться еще до истощения питательной Среды. Они остаются прикрепленными к субстрату жизнеспособными покоящимися клетками. Если такие клетки снять с субстрата и поместить в условия пониженной плотности популяции, они начнут снова делиться. На первый взгляд кажется, что клетки нормальной культуры, рост которой прекратился, располагаются в виде монослоя. Однако на самом деле в таких культурах не перекрываются лишь наиболее заметные части клеток - их ядро, тогда как цитоплазма, напротив, перекрывается на весьма значительной площади ; тем не менее такие культуры принято называть однослойными.

В отличие от нормальных большинство трансформированных клеток не переходят в стадию покоя, а продолжают непрерывно делиться. Это, по-видимому, наиболее характерная особенность трансформированных клеток. Непрерывно делящиеся клетки не реагируют на контакт с соседними клетками : натолкнувшись на своем пути на другую клетку, они не прекращают свое деления : растут они хаотически, подползая под другие клетки или наползая на них, в результате чего и образуются многослойные бесформенные массы.

Трансформированные клетки действительно выглядят злокачественными по сравнению с нормальными. Из сопоставления беспорядочной организации трансформированных клеток со строго упорядоченной организацией нормальных создается впечатление, что нормальная клетка “ощущает” момент контакта с соседней, что и приводит к остановке деления ; трансформированные же клетки не обладают таким “сесорным” механизмом и поэтому растут, наползая друг на друга. Методом замедленной киносъемки было показано, что в “разреженной” нормальной культуре при встрече двух клеток происходит остановка одной из них или обеих, а затем их движение продолжается, но в другом направлении. Этот хорошо изученный феномен известен как контактное торможение. В культуре трансформированных клеток этого не наблюдается. Именно благодаря контактному торможению культуры нормальных клеток представляют собой упорядоченные однослойные системы.

Более вероятно, что критическим фактором является не контакт с соседними клетками, а нехватка каких-то лимитирующих фаторов, необходимых для размножения. Полагают: что роль таких факторов играют вещества, содержащиеся в сыворотке крови, прибавление которой к культуре поддерживает клеточное деление. Установлено, что оптимальная концентрация сыворотки для размножения трансформированных клеток значительно меньше, чем для размножения нормальных клеток. Для понимания сущности трансформации очень важен следующий факт. Подавляющее большинство нормальных клеток размножается лишь при условии прикрепления к плотному субстрату. Трансформированные клетки, напротив, размножаются и образуют колонии и в отсутствие такой опоры, например будучи суспендированы в геле-агаровом метилцеллюлозном. Этим свойством пользуются для непосредственного отбора трансформированных клеток. Согласно данному методу, из популяции нормальных клеток, зараженных трансформирующим вирусом, отбирают отдельные клетки и высеевают в среду с агаром. выросшие в данной среде колонии состоят из трансформированных клеток.

**Изменения свойств поверхности.**

Заражение клеток трансформирующими вирусами приводит не только к упомянутым выше изменениям их морфологии и способности к размножению, но и к резко выраженным биохимическим и биофизическим изменениям их строения и функций. До сих пор объектом большинства таких исследований была плазматическая мембрана, ибо не исключена возможность, что в основе трансформации клеток лежат изменения строения и свойств именно их плазматической мембраны, хотя не менее существенные изменения происходят и в других системах. К числу первых изменений, наблюдаемых в таких клетках, относятся изменения их функций, и в частности усиление транспорта сахара.

Другое изменение - повышение аглютинабельности клеток под действием лектиков, например конканавалика А. Лектины - это природные вещества растительного происхождения, поливалентные макромолекулы которых специфически связывают определенные углеводы. Образуя поперечные связи между молекулами гликопротеидов клеточной поверхности, они вызывают агглютинацию клеток. Почти все опухолевые клетки значительно легче агглютинируются под действием лектинов, чем их нормальные предшественники. Плазматические мембраны нормальных и трансформированных клеток отличаются друг от друга по целому ряду свойств. Так, в плазматической мембране трасформированных клеток повышено содержание гиалуроновой кислоты и связанной с белками сиаловой кислоты, а содержание ганглиозидов, напротив, понижено. Так называемый LETS-белок (с мол.весом 250 000), в норме один из главных белков плазматической мембраны, в трансформированных клетках отсутствует. Поверхность трансформированных клеток также более гофрирована, чем у нормальных клеток.

Еще одним результатом трансформации клетки является повышение подвижности поверхностных белков, связывающих конкавалин А.

Сшивание белков плазматической мембраны под действием этого лектика приводит к их слиянию с образованием агрегатов - “пятен”. При одной и той же концентрации конкавалина образование пятен у трансформированных клеток значительно усилено по сравнению с нормальными. Повышенная подвижность поверхностных белков, по всей вероятности, обусловлена разрушением цитоскелета, а не изменением микровязкости липидов. Повышенной подвижностью поверхностных белков, возможно, объясняется большая склонность опухолевых клеток (по сравнению с нормальными) к аглютинации под действием лектинов. Агрегаты лектин - рецептор на поверхности трансформированных клеток служат местами формирования прочных связей между клетками ; на поверхности нормальных клеток лектины реагируют с рецепторами не столь эффективно, и потому межклеточные связи не столь прочны.

Одно из важных свойств опухолевых клеток - их инвазивность. Трансформированным клеткам также присуща инвазивность, о чем свидетельствует способность их проникать сквозь хориоллантоисную мембрану куриного эмбриона. Ни клетки первичных культур, ни клетки стабильных линий не обладают такой способностью. Возможно, что способность к инвазии является следствием вызванных вирусом изменений плазматической мембраны и (или) способности клеток выделять протеазы во внеклеточную среду. Различия между нормальными и трансформированными клетками далеко не исчерпываются различиями в свойствах их плазматических мембран. Так, заражение куриного эмбриона вирусом саркомы Рауса ведет к транскрипции генов, кодирующих синтез фетального гемоглобина, - факт прямого влияния трансформации на функцию генов. Пожалуй, правильнее всего будет предположить, что трансформацию клетки вызывают продукты вирусных генов, которые действуют как общие депрессоры, включающие транскрипцию обширных областей клетки. Именно эти деприссированные белки в конечном счете и ответственны за способность трансформированных клеток непрерывно размножаться в тех условиях, в которых деление нормальных клеток прекращается.

**Вирусная генетическая информация в трансформированных клетках.**

Все трансформированные вирусом клетки содержат его генетический материал. За исключением ДНК вируса ЭБ, который поддерживается в трансформированных им лимфоцитах в виде плазмиды, вирусная ДНК ковалентно интегрирована с ДНК клетки - хозяина. Что касается ретровирусов, то интеграция провируса с геномом клетки вообще является естественной стадией их репродуктивного цикла. В отношении ДНК опухолевых вирусов, напротив, нет данных об обязательном участии интеграции в их литическом цикле, хотя при продуктивной инфекции в таких зараженных клетках обнаружены нуклеотидные последовательности, состоящие из фрагментов вирусной и клеточной ДНК.

Наиболее убедительные доказательства линейной интеграции вирусной и клеточной ДНК представили Ботган и др. Эти исследователи расщепляли рестрикционными пидонуклеазами ДНК клеток, трансформированных вирусом SV 40, и получали фрагменты, которые содержали среди клеточных нуклеотидных последовательностей полные интегрированные с ними геномы вируса. Эти авторы установили также последовательность расположения в геноме вируса выделенных фрагментов ДНК. В результате было обнаружено, что в каждой из исследованных клеточных линий кольцевая ДНК вируса расщеплялась в разных точках и встраивалась в разные области клеточной ДНК. Таким образом, в отличие от строго локализованной интеграции генома фага Л с бактериальным геномоминтеграция генома SV 40 с геномом клетки - хозяина скорее всего представляет собой процесс неспецифический. в большинстве случаев в трансформированных клетках обнаруживаются лишь фрагменты вирусной ДНК.

В клетках, трансформированных ДНК вирусами, содержится вирус специфическая РНК. Используя сыворотки животных с опухолями, индуцированными соответствующими вирусами, методом флуоресцирующих антител установили, что в трансформированных клетках содержатся вирусные антигены. Так, в клетках, трансформированных паповавирусами, всегда содержится Т-антиген-белок, синтезируемый на ранней стадии литического цикла вируса. Следовательно, в трансформированных вирусами клетках содержатся вирусные ДНК, РНК и белки ; это наводит на мысль, что за трансформированное состояние ответственны молекулы, кодируемые геномом вируса.

**Роль трансформации при литической инфекции.**

Согласно общепринятым взглядам, способность вируса вызывать заболевание - это всего лишь побочный эффект работы механизмов, лежащих в основе размножения вируса. Для самого вируса нет очевидной “необходимости” в том, чтобы вызывать симптомы того или иного специфического заболевания у организма - хозяина. Быть может, в основе развития у вирусов способности вызывать опухоли лежит тот факт, что в делящихся клетках вирусы размножаются лучше, чем в неделящихся. По-видимому, именно на этой основе развилась характерная для онкогенных вирусов способность побуждать клетки к росту и делению. По крайней мере в отношении паповавирусов и аденовирусов такое объяснение звучит весьма убедительно : эти вирусы, проникая в клетки, вскоре индуцируют синтез ДНК, ибо синтез ДНК является одной из стадий их литического цикла. Вероятно, гены вируса, продукты которых ответственны за индукцию синтеза ДНК, - это те же самые гены, которые ответственны за трансформацию клетки. Таким образом, онкогенные свойства этих вирусов могут быть прямым следствием работы механизма их репликации. Поскольку ДНК - содержащие вирусы трансформируют клетки только при тех условиях, при которых сами размножаться не могут, их способность превращать нормальные клетки в трансформированные, т.е. в клетки способные к беспрерывному делению, может и не играть роли в их собственном размножении. Более того, вариабельность точек интеграции вирусной и клеточной ДНК наводит на мысль, что интеграция их геномов развилась в процессе эволюции случайно, а не как необходимая стадия. И действительно, в естественных условиях не описано случаев злокачественной опухоли, вызываемой паповирусами, хотя доброкачественные опухоли, например бородавки у человека и папилломы у кроликов, эти вирусы вызывают.

**Индукция опухолей.**

Реализация способности вируса вызывать образование опухолей зависит от многих факторов. Одним из критических факторов могут быть свойства самого вируса : например, избирательной способностью вызывать опухоли молочных желез обладает лишь один класс ретровирусов. Определяющим фактором могут быть и свойства клеток - мишеней, например наличие на их поверхности соответствующих неблокированных рецепторов или присутствие внутриклеточных ограничивающих факторов. Конечный результат может определяться и свойствами тканей, не содержащих клеток - мишеней для данного вируса. В качестве примера можно указать на способность организма - хозяина к иммунной реакции на данный вирус или зараженные им клетки. Чтобы заражение организма вирусом привело к возникновению опухоли, все факторы, имеющие отношение к этому процессу, в том числе физиологические и генетические, способные блокировать индукцию опухоли или ее развитие, должны быть представлены в пермиссивном варианте. Первым условием реализации вирусного онкогена является наличие в организме хозяина чувствительных к данному вирусу клеток. Когда речь идет о вирусах с узким кругом чувствительных клеток - мишеней (к числу таких относится, например, вирус лейкоза Френд, который специфически поражает только незрелые клетки мышей), следует иметь в виду, что наличие в организме чувствительных клеток может зависеть и от возраста или физиологического состояния.

Возможен и вариант, при котором в организме животного имеются клетки-мишени, однако рецепторы вирусов блокированы. Ситуация такого рода возникает, например, когда рецепторы, предназначенные для связывания с данным вирусом, блокированы вирусными глико-протеидами родственного ему эндогенного ретровируса, находящегося в клетке - мишени. Онкоген под влиянием унаследованного вируса не является простым результатом индукции латентного генома клетки - мишени. Более вероятно, что для этого соответствующий вирус должен попасть в клетку - мишень, распространяясь по организму из какого-то исходного пункта, где происходит индукция. Прямым свидетельством экзогенной инфекции клеток при наследственном лейкозе является факт увеличенного числа вирусных генов в опухолевых тканях. Иммунная система организма реагирует на опухолевые клетки лишь в том случае, если они имеют новые поверхностные антигены. Если животное предварительно иммунизировать клетками опухоли, индуцированной паповирусом, то другая опухоль, индуцированная тем же вирусом, у него при имплантации отторгается - свидетельство того, что данные вирусы вызывают на поверхности трансформированных ими клеток образование специфического опухолевого трансплантационного антигена. Этот антиген является вирус - специфическим. Так, вирус полиомы и SV 40 индуцируют различные трансплантационные антигены.

**Вирусы и злокачественные опухоли у человека.**

Одним из аргументов против роли вирусов в возникновении большинства злокачественных опухолей у человека считается тот факт, что в подавляющем большинстве случаев злокачественные опухоли не заразны, тогда как при вирусной этиологии можно ожидать передачи от человека к человеку. Если, однако, допустим, что в возникновении опухолей играет роль активация наследуемых вирусов экзогенными факторами, то следует ожидать, что будут выявлены факты наследственного предрасположения к злокачественным опухолям. Такое предрасположение к развитию некоторых опухолей действительно обнаружено, но этому можно найти различные объяснения. Несмотря на 10 лет интенсивной работы, направляемой специальными правительственными программами, связь между злокачественными опухолями у человека и вирусами все еще остается проблематичной. Представляется в высшей степени странным, что онкогенные вирусы, которые играют столь очевидную роль в возникновении опухолей у самых разных животных, должны почему-то “обходить” человек.

**Взаимодействие между вирусами растений и их хозяевами. Экспериментальные системы.**

До недавнего времени большая часть исследований, касающихся размножения вирусов растений и других аспектов взаимодействия этих вирусов с их хозяевами, проводилась с применением различных комбинаций косвенных методов, ибо отсутствовали культуры клеток растений, необходимые для количественного изучения вирусной инфекции в системе in vitro. Однако за прошедшие десять лет в этом отношении удалось добиться существенных успехов. Во-первых, был разработан метод получения протопластов клеток растений, причем оказалось, что эти культивируемые in vitro структуры можно заражать вирусами. Во-вторых, было установлено, что из организмов насекомых - переносчиков вирусов, вызывающих заболевания растений, - можно получать однослойные культуры клеток, чувствительных к соответствующим вирусам. Оба этих подхода открывают широкие возможности разработки точных методов титрования вирусов растений и изучения их биосинтеза. Уже сейчас стало ясно, что у вирусов растений общая стратегия их взаимодействия с хозяевами, реализующаяся на уровне одной клетки, та же, что и у сходных с ними вирусов животных. Протопласты, выделенные из мезофильных клеток табака, можно заразить ВТМ и таким образом, изучить одиночный цикл размножения этого вируса. Установлено, что после проникновения вирионов в клетку происходит быстрое освобождение их РНК от белковой оболочки (декапсидирование), вследствие чего инфекционность экстрактов клеток, находящихся на стадии эклипса, снижается. Декапсидирование ВТМ осуществляется путем удаления из специального капсида составляющих его субъединиц. Напротив, у ВЖМТ, имеющего икосаэдрическую форму, РНК освобождается из вириона, по-видимому, без разрушения его белковой оболочки. Освобожденная РНК превращается в репликативную и промежуточную репликативную формы с помощью механизмов, вероятно сходных с теми, которые существуют у РНК - содержащих фагов и пикорнавирусов. Вначале общее содержание вирусной РНК возрастает экспоненциально, но на более поздней стадии, когда происходит образование главным образом плюс - цепей РНК, скорость синтеза становится линейкой. Созревание вируса начинается через 4-5 ч. после заражения. Молекулы вирусной РНК, синтезирующиеся на данной и последующих стадиях инфекции, быстро заключаются в капсиды. Однако из клеток выделяется лишь очень небольшое число варионов. Для большинства заболеваний, вызываемых вирусами растений, характерно, что зараженные клетки продолжают продуцировать вирус, не подвергаясь лизису и оставаясь жизнеспособными. Благодаря этому в клетках растений, зараженных такими вирусами, как ВТМ, концентрация вируса может достигать огромных значений. Инфекция передается от клетки к клетке главным образом путем прямого переноса вирионов по межклеточным мостикам (плазмодесмам).

Количественное изучение циклов репродукции вирусов растений можно проводить на вирусах, размножающихся в однослойных культурах клеток насекомых. Так, например, для ВЖКК, относящегося к группе рабдовирусов, была получена кривая его размножения в культуре клеток цикадки, из которой видно, что стадия эклипса продолжается 9 ч., а период размножения 20 ч. ; при этом выход вируса превышает 10 000 вирионов на клетку. Провести такой точный анализ этой кривой оказалось возможным, потому что, как было установлено при помощи метода флуоресцирующих антител, данным вирусом удается синхронно заразить все 100 % клеток культуры, а новосинтезированный вирус можно эффективно оттитровать, используя для этого однослойные культуры клеток насекомых. При заражении интактных растений первый цикл репродукции вируса трудно исследовать из-за того, что вначале вирус заражает лишь очень небольшое число клеток растений, а на более поздних стадиях инфекции, когда количество вируса или вирусных продуктов становится достаточным для проведения точного анализа, циклы репродукции вируса начинают перекрывать друг друга. Если ВЖКК накапливается в культивируемых клетках насекомых в очень больших количествах, то он вызывает слияние этих клеток с помощью механизма, который, вероятно, сходен с механизмом слияния клеток под воздействием паралинсовирусов.

Репликация РНК вирусов растений, по-видимому, катализируется специфическими РНК - репликазами. Из листьев, зараженных ВТМ, были выделены две формы РНК - репликазы. Одна из них - нерастворимая форма, связанная с РНК ВТМ и способная катализировать синтез специфической РНК с использованием рибонуклеозидтрифосфатов. Вторая - растворимая форма с молекулярным весом около 150 000, способная использовать в качестве матрицы для неспецифического синтеза РНК любую из нескольких исследованных в этом отношении РНК. Связанная форма репликазы, которую можно экстрагировать из клеток на поздних стадиях вирусной инфекции, катализирует главным образом синтез плюс - цепей вирусной РНК.

РНК ВТМ представляет собой одиночную цепь с молекулярным весом 2,3 10 , способную кодировать полипептид с молекулярным весом около 2,4 х 10 . В системе in vivo эта РНК кодирует синтез нескольких белков, в том числе белка оболочки (молекулярный вес 17 500) и двух больших полипептидов (молекулярный вес 160 000 и 140 000). Совершенно очевидно, что генетической информации, содержащейся в плюс - цепи РНК ВТМ, было бы недостаточно для кодирования всех этих белков, если бы они синтезировались независимо друг от друга. Следовательно, либо нуклеотидные последовательности, кодирующие синтез этих белков, перекрывают друг друга, либо сначала синтезируется длинный полипептид, который затем расщепляется на более мелкие полипептиды, либо какой-то из этих полипептидов синтезируется на минус - цепи РНК.

**Цитологические данные, полученные при изучении вирусных инфекций.**

В течение долгого времени считали, что репликация ВТМ происходит только в цитоплазме. Однако некоторые данные, полученные при цитологических и цитохимических исследованиях, позволяют предполагать, что первичным местом репликации РНК этого вируса является, вероятно ядро. Эксперименты с использованием конъюгированных с ферритином акти - ВТМ - антител показывают, что белок ВТМ появляется в клетках листьев через несколько дней после их заражения и сначала обслуживается в цитоплазме главным образом вокруг ядерной мембраны. Белок ВТМ выявляется также и в ядре клетки, однако, судя по результатам электронной микроскопии, завершенные вирионы содержаться только в цитоплазме, но не в ядре. Напротив, вирионы некоторых других вирусов растений, например вируса штриховатости ячменя, обнаруживаются в нуклеоплазме. На срезах клеток, зараженных вирусом желтой карликовости картофеля, для которого характерно наличие внешней оболочки и который морфологически весьма напоминает рабдовирусы, видно, что вирионы этого вируса тесно ассоциированы с ядерной оболочкой. Возможно, что ядерная оболочка служит источником некоторых компонентов входящих в состав внешней оболочки этого вируса. В ядре вирионы этого вируса не обнаруживаются.

Одним из наиболее частых и характерных воздействий, оказываемых вирусами растений на клетки, является образование внутриклеточных включений. В большинстве случаев эти включения представляют собой агломераты вирусных частиц, либо свободных, либо связанных с составными частями клетки. Морфология и локализация включений варьируют в зависимости от вируса, вызвавшего заболевание. Большинство вирусов растений образует только цитоплазматические включения, но вирус гравировки табака, а также некоторые другие вирусы образуют кристаллические включения в ядре клетки. Включения, формирующиеся в клетках, зараженных другими вирусами растений, также могут быть кристаллическими или амебоидными. в клетках опухолей, вызываемых вирусом раневых опухолей, обнаруживаются цитоплазматические шарики, или вироплазмы, состоящие из микрокристаллов этого вируса.

**Распространение вирусов по растению.**

Вирусы, введенные в растение путем механической инокуляции, медленно распространяются по непроводящей ткани от первично зараженных клеток к соседним. Скорость распространения ВТМ составляет примерно 1 мм в день, а иногда и меньше. По-видимому, вирус, попавший в клетку, сначала в ней размножается, а затем уже проникает в соседние клетки по межклеточным канальцам, или плазмодесмам. Прежде чем ВТМ начинает двигаться из первично зараженной клетки в соседнюю, проходит несколько часов. Из одной клетки в другую могут мигрировать как интактные вирионы, так и вирусная РНК ; с помощью электронной микроскопии вирионы были обнаружены в плазмадесмах. По тканям растения могут распространяться также и вирионы, неспособные к созреванию.

Когда вирус попадает в проводящую ткань либо из соседних паренхимных клеток, либо непосредственно вводится туда насекомым - переносчиком, он быстро движется сначала по жилкам, затем по черешку листа и, наконец, попадает в стебель. В принципе вирус может распространиться по всему растению, причем степень генерализации процесса зависит как от свойств вируса - хозяина. Большинство вирусов, переносимых механически, относится к числу гистологически “неограниченных” вирусов, а это означает, что они могут проникать почти во все ткани зараженного растения. Как правило, первыми атакуются вирусом активно растущие ткани и корни. Перенос вируса на значительные расстояния происходит главным образом по флоэме вместе с током пластических веществ, хотя вирусы могут мигрировать и по водопроводящей ткани растения - ксилеля. Вирусы могут перемещаться вместе с водным раствором органических веществ по членикам ситовидных трубок флоэмы, но это не обязательно приводит к заражению вирусом этих клеток. Однако некроз флоэмы при вирусных болезнях растений - отнюдь не редкое явление, доказательством чего может служить некроз этой ткани, вызываемый вирусом скручивания листьев картофеля. Перенос вирусов семенами наблюдается редко, а перенос пыльцой - еще реже. Особенности процесса морфогенеза цветка, очевидно, таковы, что они препятствуют проникновению вируса в гаметы. Вообще же клетки апикальных меристем, зараженных вирусом растений, как правило, содержат мало вируса, а иногда и вовсе свободны от вирусных частиц.

Степень распространения вируса по зараженному растению определяется ответной реакцией зараженных клеток на инфекцию, а сама эта реакция может быть весьма различной. К наиболее выраженным ее проявлениям относятся некротические поражения. В этом случае клетки погибают так быстро, что часто даже не успевают передать вирус соседним клеткам. Обнаружено, что при некротической вирусной инфекции в клетках повышается уровень полифенолоксидазы.

К наиболее выраженным проявлениям реакции растений на заражение вирусом относятся почти бессимптомные инфекции, обнаруживаемые лишь по очень слабым симптомам или благодаря тому, что вирус, не причиняющий явного вреда одним растениям, вызывает заболевания других. В этих случаях зараженные клетки повреждаются незначительно и, как правило, сохраняют способность к делению. Типичной реакцией клеток растений на заражение некоторыми вирусами является интенсивное их деление и даже опухолевая трансформация. Механизм опухолеродного действия вируса раневых опухолей пока остается неизвестным. Неясно также, какую роль в этом процессе играет пфанение растении. Следует учитывать возможность совместного действия гормонов растений с вирусами (синергизм) в процессе индукции и стимуляции роста опухоли. Большая часть изменений обменных процессов наблюдаемых при вирусных болезнях растений, вероятно возникает в результате побочных воздействий, оказываемых вирусной инфекцией на процессы фотосинтеза, дыхания, регуляции роста, а также тракспорта воды, пластических и других веществ. Нарушения регуляции роста приводят к морфогенетическим аномалиям самой различной значимости - от мозаичности листьев и цветков до некротических поражений и аномальной пролиферации побегов и образования опухолей. В местах некротических поражений часто накапливаются некоторые вещества типа скополетина - флуоресцирующего ароматического соединения, однако доказательства специфической роли вируса в биосинтезе этих веществ пока отсутствуют.

**Механизмы передачи вирусов растений.**

Механическая передача вирусов растений на поверхность листа может быть осуществлена в эксперименте со многими вирусами, однако маловероятно, чтобы такой путь передачи был основным способом распространения вирусов растений в естественных условиях. Одним из немногих исключений в этом отношении является ВТМ. Передачу почти любого вируса можно осуществить прививкой. Хотя этот способ заражения используется главным образом при экспериментальных исследованиях, он может играть значительную роль в распространении вирусных болезней плодовых деревьев и декоративных кустарников. Паразитное растение повилика, гаустории которой внедряются в стебли растений - хозяев (таким образом устанавливается живая связь между сосудистыми системами растения - хозяина и паразита), служит полезным инструментом для изучения передачи вирусов новым хозяевам. Однако очевидно, что такой механизм передачи вирусов не может быть основным способом их распространения в природе.

**Передача вирусов растений членистоногими переносчиками**.

В естественных условиях наиболее важную роль в передаче вирусов от одного растения к другому играют животные, питающиеся на этих растениях. Иногда передача вируса растению переносчиком осуществляется чисто механическим путем, но в большинстве случаев - это специфический процесс, отражающий определенные связи, существующие между вирусом, переносчиком и растением.

Основными переносчиками вирусов растений служат членистоногие, особенно насекомые, но иногда также и клещи. Есть много общего между взаимоотношениями некоторых вирусов растений с их членистоногими - переносчиками и взаимоотношениями арбавирусов животных (переносимых членистоногими) с их переносчиками. Членистоногие - переносчики с колющим хоботком, высасывающие сок растений, весьма эффективно переносят вирусы, поскольку они обладают способностью вводить вирус в относительно глубоко расположенную ткань растения - флоэму. Небольшое число вирусов попадает в ксилему, значительно большее их число встречается во флоэме. Наиболее широк спектр вирусов растений, переносимых тлями. Различают несколько типов передачи вирусов растений насекомыми :

1) Внешняя передача, осуществляемая стилетом, без персистенции вируса в организме переносчика. В этом случае вирус сорбируется на вершине стилета насекомого, когда оно питается на зараженном растении, и может быть сразу же перенесен на здоровое растение. Способность к передаче вируса может быть утрачена очень скоро, а может и сохраняться в течение нескольких дней, но не обнаруживается после очередной линьки. Возможно, что некоторые продукты жизнедеятельности растений способствуют переносу вируса по этому механизму.

2) Регургитативная передача.

Вирус сохраняется в передней кишке насекомых (тлей и жуков) в течение довольно длительного времени и передается здоровому растению путем отрыгивания содержимого кишки.

3) Циркулятивная передача.

При данном типе переноса вирус может быть передан другому растению не сразу после питания переносчика на больном растении, а лишь по окончании определенного латентного периода. Продолжительность его может составлять от нескольких часов до нескольких дней. При такой передаче способность переносчика передавать вирус другому растению сохраняется намного дольше, чем при регуртативной передаче. Было показано, что вирус циркулирует в тканях насекомого и при линьке оно не утрачивает способности к переносу вируса.

4) Пропагативная передача.

Вирус действительно размножается в тканях насекомого, прежде чем достигает его ротовых частей. Длительность латентного периода определяется временем, необходимым для размножения вируса. В конечном счете вирус попадает в слюнные железы насекомого и со слюной переносится в растение. Большой класс переносчиков вирусов растений - цикадки почти всегда осуществляет передачу вирусов растениям именно по этому механизму. К данному классу относится переносчик вируса раневых опухолей и многие другие.

Способность насекомого переносить тот или иной вирус контролируется генетически и может определяться различием в одном гене, который, по-видимому, контролирует проницаемость кишечника для вируса. В пользу такой точки зрения говорит тот факт, что после пункции брюшка насекомое, неспособное передавать вирус, приобретает эту способность. Аналогичное явление наблюдается и у насекомых - переносчиков некоторых вирусов животных.

Принимая во внимание тесные связи между насекомыми и растениями, которыми они питаются, можно предположить, что вирусы в ходе эволюции распространились от одного класса хозяев к другому и оказались избирательно адаптированными к “двойному” образу жизни. Существенный этап инфекции такого рода представляет проникновение в клетку вирусной нуклеиновой кислоты, генетические потенции которой, объединенные с генетическими потенциями клетки, и определяют возможность размножения вируса. Способ проникновения вирусной нуклеиновой кислоты в клетку, вероятно, имеет менее важное значение, чем метаболические и биосинтетические условия, существующие в клетке, в которую проник вирусный геном.

Как уже упоминалось выше, некоторые вирусы растений, передаваемые насекомыми, по ряду свойств напоминают вирусы животных.

**Передача вирусов растений нематодами и грибами**.

Заболевания растений, передающиеся через почву, известны давно. Однако роль нематод в переносе некоторых вирусов растений, в том числе вируса кольцевой пятнистости табака и вируса погремковости табака, была установлена относительно недавно. Эти черви “приобретают” и передают вирус парзитируя на корнях растений, и могут служить ему убежищем в течение ряда месяцев, однако через яйца вирус, по-видимому, не передается потомству червей.

Известно, что вирус некроза табака и по крайней мере еще два вируса растений переносятся примитивным паразитическим фикомицетом. Способность к передаче специфична как в отношении штаммов вируса, так и в отношении штаммов переносчика, и вирус переносится, по-видимому зооспорами гриба. Другие грибы, вероятно, также могут служить переносчиками вирусов, связанных с почвой.

**Вирусы, патогенные для насекомых.**

**Включения в их связь с вирусной инфекцией.**

У насекомых известно много различных вирусных болезней. Некоторые из них поражают полезных насекомых, таких, как тутовый шелкопряд, другие - насекомых - вредителей, в борьбе с которыми они могут играть важную роль. При многих вирусных заболеваниях насекомых в их клетках образуются полиэдрические включения. Поэтому такие заболевания были названы полиэдрозами. Полиэдры - специфические продукты инфицирующих клетку вирусов. При одних инфекциях они образуются в ядре клеток, при других - в цитоплазме. При некоторых вирусных заболеваниях, называемых гранулезами, в пораженных клетках образуются не полиэдры, а гранулярные включения, или капсулы. Иногда патогенные для насекомых вирусы вовсе не образуют внутриклеточных включений.

**Ядерные полиэдрозы.**

Ядерные полиэдрозы были описаны у чешуекрылых, перепончатокрылых и двукрылых. Типичным примером может служить полиэдроз тутового шелкопряда. Через несколько дней после инъекции гусенциале вируса или поедания ими инфицированного корма в ядрах клеток большинства тканей появляются мелкие включения. Постепенно их число и размеры увеличиваются и некоторые из них могут достигать 10-15 мкм. В одном ядре может содержаться до 100 полиэдров. Ядерный хроматин исчезает, клетки в концов гибнут, и свободные полиэдры появляются в гемолимфе. Полиэдры тутового шелкопряда представляют собой кристаллы, состоящие из белка с большим молекулярным весом (около 300 000), который состоит из субъединиц с молекулярным весом около 20 000. Белок полиэдров очень устойчив к действию протеолитических ферментов.

Белки полиэдрических включений, выделенных от различных насекомых, дают перекрестные серологические реакции, но между белками организма - хозяина и белками полиэдров серологического родства нет. Возможно, что белки полиэдров кодируются структурными генами вируса. Некоторые вирусы удавалось в эксперименте передавать другим насекомым - хозяевам, хотя частое наличие у насекомых латентных вирусов осложняет интерпретацию таких результатов. Белки полиэдров, образуемых данным вирусом у разных хозяев, серологически идентичны. Внутри полиэдров лежат вирусные частицы, расположенные поодиночке или группами. Подвергая полиэдры мягкому щелочному гидролизу, легко выделить содержащиеся в них вирионы. Они состоят в основном из палочкообразных капсидов, внутри которых находится двухцепочная ДНК, окруженная двумя мембранами - внутренней (это, вероятно, один слой белка, соответствующий капсиду) и внешней, окружающей скопления вирусных частиц и состоящей из белка и липидов.

Для ДНК каждого вируса насекомых характерен свой нуклеотидный состав. Количество ДНК в каждом вирионе составляет около 10 дальтон. Размеры вирионов у разных вирусов насекомых варьируются в пределах от 30 до 50 нм в поперечнике до 200-320 нм в длину. Наряду с такими крупными часто встречаются и мелкие частицы - не развивающиеся, а скорее неполные или распавшиеся вирионы.

**Латентные инфекции.**

Одна из удивительных особенностей вирусов насекомых - их способность сохраняться в организме хозяина в латентном состоянии в течение многих генераций. У насекомых почти наверняка имеет место трансовариальная передача вируса, хотя не исключается и возможность заражения личинок во время их выкормки. Находясь в латентном состоянии, вирус не вызывает каких-либо видимых симптомов. Однако он может быть активирован каким-либо внутренним или внешним фактором, что приводит к синтезу инфекционного вируса и появлению симптомов болезни. Такое действие может оказать тепловой шок или смена пищи, например замена листьев одной шелковицы листьями другой. Сходный эффект получали с помощью рентгеновских лучей и некоторых веществ. Так, Ямафудзи сообщил, что у тутового шелкопряда стимулами , провоцирующими симптомы полиэдроза, могут служить формальдегид, гидроксиламин, перекиси, оксины и нитриты. На основании этих данных Ямафудзи выдвинул теорию об образовании полиэдрических вирусов из генетического материала хозяина в результате мутагенного воздействия на хромосомную ДНК. Интересно, что к этой мысли он пришел тогда, когда мутагенные свойства многих из упомянутых веществ еще не были известны. Однако теория Ямафудзи не встретила большой поддержки, так как известно, что намеренное заражение гусениц тутового шелкопряда вирусом полиэдроза часто приводит не к заболеванию, а к латентной инфекции. Значит, гусеницы, у которых после химического воздействия проявляются вирусы, уже могли быть его скрытыми носителями. Поэтому “провирусная” теория латентности вирусов полиэдроза кажется более правдоподобной, чем теория образования вирусных геномов из генетических элементов клетки- хозяина.

**Агент, вызывающий у дроздофилы чувствительность к СО .**

Важная серия исследований была посвящена изучению трансмиссивного агента, контролирующего чувствительность к СО некоторых рас дроздофилы. При концентрации СО , вызывающей у устойчивых мух лишь обратимое состояние наркоза, у чувствительных мух наступает паралич, и они погибают. Генетический фактор, ответственный за эту особенность, получил обозначение О. Своей трансмиссивностью, мутабильностью, размерами и специфичностью по отношению к хозяину он напоминает вирус. В некоторых отношениях он сходен с умеренными бактериофагами. В организме мух, чувствительных к СО , содержится вирус, который можно извлечь из их тканей и инъецировать устойчивым мухам, в результате чего последние тоже становятся чувствительными. Чувствительность к СО возникает через несколько дней, причем это время зависит от величины инокулума. Судя по инфекционным титрам экстрактов, полученных из инокулированных вирусом мух, содержание вируса в организме сначала снижается, а затем быстро возрастает до максимума, и именно в это время мухи становятся чувствительными к СО . Вслед за заражением устойчивых к СО , но восприимчивых к вирусу мух этот вирус после периода эклипса проходит стадии вегетативного размножения и созревания, в результате чего содержание вирионов - потомков в организме мухи достигает определенного максимума. Когда количество вегетативного вируса достигает пороговой величины, муха становится чувствительной к СО . Стабильное состояние, возможно, соответствует более интимной интеграции вируса с организмом хозяина, при которой вирус переходит в неинфекционное состояние и лишь изредка может порождать зрелые вирионы. Стабилизированная форма вируса может передаваться самками всем потомкам обоего пола. При внесении вируса в зиготу мужской гаметой он переходит в нестабилизированную вегетативную форму.

Был установлен неожиданный и важный факт - морфологическое сходство вируса О с рабдовирусами. Более того, оказалось, что один из рабдовирусов - вирус везикулярного стоматита, - будучи введен дроздофиле, может вызывать персистентную инфекцию и обуславливать стабильную чувствительность у СО . Таким образом, установлен еще один случай родства между вирусами, найденными у очень далеких друг от друга хозяев.

**Происхождение и природа вирусов.**

**Вирусы как независимые генетические системы.**

Какое место занимают вирусы в биологическом мире ? Каково их происхождение и кто их ближайшие родственники ? Сведения о вирусах, изложенные в этой книге, четко подтверждают положение, высказанное в самом ее начале : вирусы нельзя уподоблять очень мелким клеткам. Вирусы - это элементы генетического материала, у которых есть своя собственная эволюционная история, ибо в них имеется все необходимое для их передачи от одного хозяина другому.

В этом смысле вирусы представляют собой независимые генетические системы. Это не случайно отделившиеся фрагменты генома какой-то клетки. Вирусам присуща генетическая непрерывность и способность мутировать, они содержат набор генов, в результате согласованного действия которых образуются новые частицы того же вируса. И наконец, вирусы имеют свою эволюционную историю, по крайней мере отчасти независимую от эволюции организмов, в которых они репродуцируются. В то же время вирусы не стоят в стороне от эволюционной истории клеток и организмов. Их генетический материал в химическом отношении сходен с генетическим материалом всех клеток, хотя у многих вирусов он состоит из РНК - кодирующего полимера, оттесненного в процессе эволюции клеток на второстепенную роль, в клетках РНК служит подсобным переносчиком генетической информации, а не ее первичным носителем. Если сравнить ДНК с Солнцем, то клеточные РНК будут планетами, которые светят отраженным светом ; однако в РНК - содержащих вирусах эти планеты вновь стали самостоятельными светилами.

Между тем независимость вирусов как генетических систем сама подвержена эволюционным изменениям. Например, геном умеренного фага может как физически, так и функционально интегрироваться с геномом бактерии. Он может существовать в двух формах - в виде вируса и в виде группы хромосомных генов клетки - хозяина. Когда в результате мутации умеренный фаг теряет способность превращаться в профаг, он утрачивает одну из своих форм существования - становится в большей степени клеточным компонентом, набором генов клетки. И наоборот, когда профаг мутирует, превращаясь в дефектный профаг ( т.е. в профаг, неспособный осуществлять все функции, необходимые для собственной репродукции и заражения другой бактериальной клетки), он как бы, становится в меньшей степени вирусом и в большей - клеточным компонентом, теперь его дальнейшее существование зависит от сохранения данной клеточной линии или же от “помощи” со стороны другого, недефектного вируса.

Хотя физическая интеграция генома вируса с хромосомой клетки - хозяина детально изучена только в системе фаг - бактерия, известно, что многие опухолеродные вирусы тоже включают свой геном в хромосому клетки. Во всех группах вирусов известны также дефектные вирусы, нуждающиеся в помощнике. И это не только варианты, изредка возникающие в лабораторных экспериментах : такие вирусы существуют в природе и, несомненно, имеют значение для эволюции. Превращение обычного вируса в дефектный, включившийся в геном клетки - хозяина, формально можно рассматривать как превращение группы вирусных генов в подгруппу генов клетки. И наоборот, группы клеточных генов могут превращаться в геномы вирусов, и это относится не только к генам, внесенным в клетку вирусами. Не исключено, что вирусные геномы могут возникать из невирусных генетических элементов клетки. И мы должны поставить вопрос : какие события играют важную роль в возникновении вирусов как организмов и в эволюционной истории их генетического материала.

**РНК - содержащие вирусы и клеточные РНК.**

Само существование РНК-вирусов ставит ряд трудно разрешимых вопросов. Ни у бактерий, ни у других организмов нет ничего достаточно похожего на репликацию генетического материала в форме РНК. Правда, данные о том, что РНК - содержащие фаги, относящиеся к одной и той же группе, обладают разными специфичными для каждого фага механизмами репликации, заставляют воздерживаться от окончательных выводов. Если эти данные верны, то не исключено и существование пока еще не выявленных клеточных РНК - реплицирующих систем. Такую возможность действительно постулировали, но большей частью без достаточных оснований.

Если же клеточных аналогий не окажется, нам придется выбирать одну из ряда других альтернатив. Например, мы может рассматривать РНК - содержащие вирусы как уникальную группу, представляющую особое направление эволюции. Можно также предположить, что эти вирусы произошли от ДНК - вирусов, информационная РНК которых приобрела способность прямой репликации, так что транскрипция ее с ДНК стала излишней. Но если считать это возможным, то нет причин ограничиваться гипотезой возникновения РНК - вирусов на основе вирусной информационной РНК : столь же серьезно мы должны рассмотреть и возможность происхождения таких вирусов от клеточных информационных РНК.

Необходимым для этого этапа было бы приобретение соответствующего механизма репликации и способности к образованию вирионов. Существование вирусов, кодирующих обратную транскрптазу - фермент, транскрибирующий РНК вириона в соответствующую ДНК, - показывает еще одну возможность : некоторые вирусы могли бы приобрести РНК - репликазу, что позволило бы им обойтись без обратной транскрипции, а заодно исключило бы возможность их интеграции с хромосомой клетки. Перечисленные выше возможности, взятые в целом, иллюстрируют ряд путей, которые могли бы при участии механизмов репликации РНК вести к превращению сегментов хромосомного генетического материала вирусные гекомы и наоборот. К сожалению, слишком большие пробелы в наших знаниях пока не позволяют построить обоснованную модель такого рода.

Еще одну загадку составляет существование вирусов с генами из нескольких фрагментов двухцепочечной РНК. Среди таких вирусов есть паразиты самых различных организмов - бактерий, грибов, растений, насекомых и позвоночных. Произошли ли все эти вирусы от общего предка ? Или разные группы их возникали независимо на разных путях эволюции вследствие каких-то преимуществ, связанных с подобным строением генома ? Ответов на эти вопросы пока нет.

**Происхождение вирусов и происхождение клетки.**

Проблема происхождения вирусов - это, по существу проблема независимости генетических элементов в репродуктивном и эволюционном отношении. Основные вопросы здесь касаются того, насколько длинный путь прошли вирусы в своей независимой эволюции и в какой точке разошлись пути эволюционного развития вирусов и тех генетических элементов, которые мы находим в настоящее время в клетках. Вирус, проникнув в клетку, может оставаться в ней либо в течение какой-то доли клеточного цикла, либо на протяжении многих клеточных генераций. У организмов, размножающихся половым путем некоторые вирусы могут передаваться последующим поколениям через гаметы. Вирус, долго сохраняющийся в клетке, практически не отличим от клеточного компонента. Такую частицу мы могли бы счесть вирусом, плазмидой или геном в зависимости от типа воздействия, благодаря которому ее удалось обнаружить. Таким образом, проблема происхождения вирусов включает : 1) вопрос об отношении между вирусами и клеточными компонентами, 2) вопрос о происхождении клеточных компонентов и 3) вопрос о родстве между различными генами вирусов. Довольно широко распространено представление о “монофилетическом” происхождении клетки - о том, что набор ее генов, то есть геном создавался в результате дифференциации одного исходного самовоспроизводящегося элемента, копии которого иногда не разделялись и благодаря мутациям приобрели различные формы и функции. Из таких групп генов должны были затем образоваться хромосомы, ибо наличие какого-то организованного механизма, обеспечивающего равное распределение генетического материала, дает большое преимущество - помогает сохранять благоприятные комбинации генов.

Появление полового процесса в ходе дальнейшей эволюции усложнило эту схему, однако у организмов, у которых еще не было полового процесса, все гены должны были возникнуть в пределах одной клеточной линии. Согласно самой простой гипотезе, цитоплазма целиком является продуктом деятельности генов. Таким образом, все генетические компоненты клеток, относящихся к одной линии, должны иметь единое происхождение. Передача генетического компонента - гена или хромосомы - другой клетке была бы уже слиянием части генетического материала одной линии с геномом другой линии. С другой стороны, не исключена возможность и полифилетического происхождения нормальной клетки. Несколько первичных самореплицирующихся молекул могли, объединившись, создать благоприятную комбинацию и сформировать в дальнейшем клеточный геном. Или же, наконец, какие-то генетические элементы могли проникнуть в уже образовавшуюся клетку. Слияние генетического материала разных линий могло бы произойти на относительно раннем этапе эволюции клетки, и тогда приобретение геном, хромосомой или плазмидой способности переходить из одной клетки в другую было бы возвращением к исходной независимости и повторением исходного процесса слияния.

Таким образом, все теории происхождения вирусов сводятся к рассмотрению различных возможностей слияния двух или большего числа генетических элементов и образования из них функционирующей генетической системы. В случае вирусов, вызывающих быстрое разрушение клетки, такое слияние может не быть очевидным, и фундаментальное значение этого процесса не было замечено ранними вирусологами, для которых вирус, размножающийся в клетке, был подобен бактерии, растущей в культуре. На самом же деле даже клетка, зараженная вирулентным вирусом и обреченная на быструю гибель, представляет собой функциональную систему, чья конечная судьба - полная дезинтеграция - это лишь побочный результат главного события, а именно генетической и биохимической интеграции вирусных и клеточных механизмов. Слияние может приводить к длительной интеграции клетки с вирусом, которая сохраняется в течение нескольких клеточных генераций, иногда даже при половом процессе. В случае профагов, а возможно, и некоторых опухолеродных вирусов интеграция может стать почти постоянной. Некоторые плазмиды и, быть может, даже сегменты хромосом могли сформироваться именно таким путем. С другой стороны, эволюция механизмов, реализующих передачу генетического материала, могла привести к превращению отдельных генов и групп генов в плазмиды и вирусы.

Из всех живых существ, быть может именно для вирусов монофилетическое происхождение наименее вероятно, ибо вирусы всегда реплицируются в окружении больших количеств невирусных нуклеиновых кислот, способных включаться в их геном. К какой категории мы отнесем данный генетический элемент - к генам, плазмидам, или вирусам, - в конечном счете будет зависеть от того, насколько длительным был период общности его эволюционной истории с историей других компонентов генома. Способность к возвращению независимости может определяться не только мутабельностью, но длительностью совместного существования, которая может приводить ко все большей взаимозависимости между различными компонентами клетки. Экзогенный элемент внесенный в клеточную линию, вероятно, подвергнется столь же выраженным эволюционным изменениям, как и любой другой генетический компонент клетки, и будет не более похож на своего первичного предка, чем похожи на своих предков эти компоненты.

Передаваемые генетические элементы, быстро разрушающие новую для них клеточную систему, должны были бы в большинстве случаев исчезать, так как они могли бы сохраниться только при доступности для них бесчисленного множества клеток - хозяев. Часто, однако, слияние могло быть долговременным. При этом остается важный вопрос, на который пока нельзя ответить : является ли такое слияние новой и необычной особенностью, ведущей в основном к образованию аномальных комплексов, не имеющих значительной эволюционной ценности, то есть больных клеток, или же это один из процессов, который играл и все еще играет существенную роль в эволюции ( а возможно и в онтогенезе) ?

Вирус может быть и регрессировавшим паразитом, и фрагментом клеточного генома, ставшим инфекционным, в зависимости от того, какую фазу его эволюционной истории мы наблюдаем. В различное время он может быть и тем и другим. Подобно тому как изучение структуры и размножения вирусов в конце концов всегда приводит нас к клетке как системе, в которой имеют место проявления жизни, так и проблема происхождения вирусов возвращает нас к вопросу о происхождении клеток как интегрированного целого.

Вирус - это, по существу, часть клетки. Мы считаем вирусами те компоненты клетки, которые достаточно независимы для того, чтобы передаваться другим клеткам, и сравниваем их с другими клеточными компонентами, более прочно связанными со всей системой. И именно эти свойства вирусов делают их бесценными для биологов, предоставляя им уникальную возможность наблюдать в относительно изолированном виде активные детерминанты биологической специфичности - по истине те кирпичики, из которых построено все живое.