

Изменчивост на вирусите

Ангел С. Гълъбов, Симеон А. Гълъбов

Те притежават богат арсенал – необичайни видове геноми, специфични ензими, възможност за залавяне за специфични

рецептори на клетката и за навлизане в нея, използване на клетъчните апарати за белтъчен синтез (рибозоми) и за продукцията на енергия (митохондрии), клетъчните и ядрени мембрани за формиране на обвивката си, някои части от генома на клетката за синтеза на собствения геном (грипен вирус), дори в клетъчната мембрана за изход, самосглобяване при формирането на вирионите (вирусните частици), взаимодействие с клетъчния геном (в ядрото) за свързването и въграждането в него.

Оръжията на човека – срещу този опасен противник учените създават ваксини, антивируси (инхибитори на вирусната репликация – спрямо грип, херпес симплекс, хепатит С, вариола, HIV, епидемичен кератоконюнктивит и др.), специфични антисеруми (имуноглобулинови концентрати), имуностимулатори, противовъзпалителни препарати. Ефективен подход е и карантиниране-

Историята на епидемиологията е история на едно вечно и безкрайно сражение – между вирусите и човека. В тази битка основните **оръжия на вирусите** са способностите им да мутират.

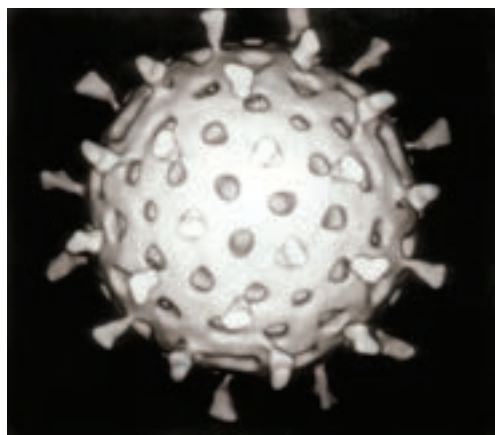
мо. Битката е оспорвана и се води с променлив успех, без категоричен победител.

Главното оръжие на вирусите е тяхната изменчивост. Способността им да мутират е заложена в природата им – в структурата на техния геном (РНК или ДНК) и вирус-специфични протеини и в начина на размножаването (репликацията) им в клетката-гостоприемник. Както е известно, вирусите се представят в две форми – извънклетъчна форма, вирион (вирусна частица) и вътреклетъчна форма, в която се осъществява реализирането на вирусния геном. За вирусите е характерен сравнително бедният спектър в морфологията на вирионите, в пълен контраст с голямото разнообразие в структурата на геномите им и тяхното функциониране. Доказани са минимум пет пътя на главната догма в биологията – как информацията, заложена в генома, да се пренесе в синтеза на протеини. При микроорганизмите, растенията и животните е позната една единствена пътека – от ДНК → информационни

РНК (иРНК, messenger RNA, mRNA) чрез транслация → протеин. При вирусите обаче бяха доказани минимум шест пътеки: гвверижна (гв) ДНК → и(+)РНК → протеин (херпесвируси, папилома- и полиомавируси, агено- и поксвируси); едно-верижна (ев) ДНК → гвДНК → и(+)РНК → протеин (парвовируси); РНК чрез ензима обратна транскриптаза → ДНК → и(+)РНК → протеин (ретровируси); еврНК с качества на иРНК (+РНК) → гв(±)РНК → (+)РНК → протеин (пикорна/ентеровируси и др.); сегментирана/несегментирана РНК (-) РНК чрез ензим вирионна транскриптаза → иРНК (+)РНК → протеин (грипни вируси, парамиксовируси, рабдовируси, филовируси); гв (±)РНК → (+)РНК → белтък (ротавируси) и др.).

Степената на мутиране варира значително при отделните таксономично разнообразни групи (семејства) вируси. Тя е сравнително ниска при ДНК вирусите. Но и тук се наблюдават мутанти с променени свойства. Така например, **херпесвирус ВХС-1/2** развива мутанти, резистентни на най-активното противохерпесно вещество ациклоуанозин (ацикловир, АСВ). Такива мутанти се изолират от пациенти с неоплазми или подложени на имunosупресанти след трансплантация на органи, или от лица с тежко протичащи банални инфекции. С оглед разработването на антивирали спрямо вируса варицела-зостер и цитомегаловируса проучването на мутантите, водещи до резистентност, е от първостепенно значение.

Епидемичният грип е масово, социално значимо заболяване. Неслучайно неговото историческо и масово използвано название е инфлуенца (от итал. *influenza*, навлиза в европейските езици след епидемия от XVIII век, която тръгнала от Италия). Причинява се от ортомиксовирусите **грипни вируси А и В**. При тези



Компютърно обработен образ на ротавирус.
Автор Греъм Беардс



Учен, изследващ грипен вирус

вируси са познати два типа генетични промени. Ежегодните сезонни (есенно-зимни) вълни на грип се дължат на



Академик Ангел Гълъбов, г.м.н е специалист по вирусология. Основател на Балканското дружество по микробиология. Председател на Българското микробиологично дружество. Активен член на International Society for Antiviral Research. Автор на 320 публикации и 39 патента и изобретения. Преподавател във висши училища, ръководител на 21 докторанта.

мутации в гените на повърхностните протеини на вирионите – хемаглютинин (Н-протеин), осигуряващ контакта на вирионите с клетката гостоприемник, и невраминидаза (N-протеин), осъществяваща излизането на дъщерните вириони от клетката гостоприемник вирус А. Това типично за грипния вирус явление на ежегодни мутации се нарича *антигенен дрейф*. Наред с това през големи интервали от време се наблюдава „революционна“ промяна в генома – *антигенен шифт* основан на реасортиране. Реасортирането е изменчивост, свързана със структурата на генома на грипните вируси, състоящ се от осем сегмента, всеки от които носи информация за синтеза на отделни протеини. Налице е процес на замяна на сегменти – с навлизане на сегменти, главно Н от птичи вируси, осъществявано в организма на заразени свине (организъм смесител).

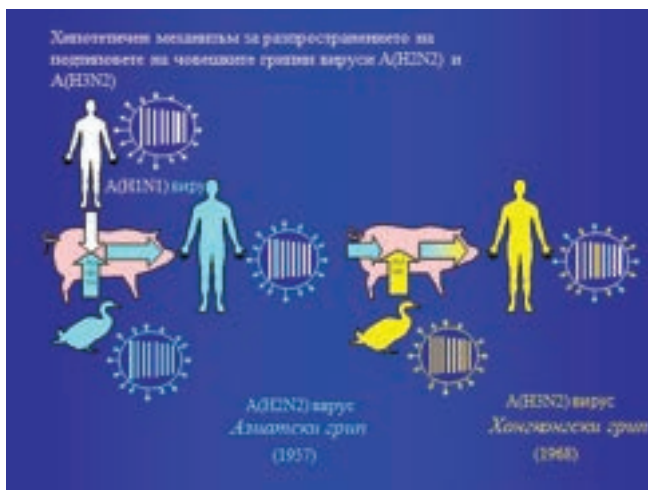
Антигенният шифт е в основата на грипни пандемии, засягащи милиони хора от всички континенти – той е доказан при пандемията от така наречения „азиатски грип“, стартираше през 1957 г. с причинител А(Н2N2); при „хонгконгския“ грип с причинител А(Н3N2) 1968 г.; и при първата през XXI век пандемия от „свински“ грип с причинител А(Н1N1) 2009 г. Процесите на реасортиране са илюстрирани на приложените фигура и таблица. Появилият се в края на XX век в Югоизточна Азия вирус на птичия грип А(Н5N1) със силно патогенен за човека потенциал, свързан със свойството да атакува рецептори дълбоко в бронхиалното дърво, за щастие не стана антропофилен. Вирусът бе летален за близо 60% от първоначално заразените, без да засегне контактните с тях. Този вирус се разпространи в Южна Азия, Близкия Изток и Северна Африка. Установено бе, че спрямо N2-блокери



Симеон Гълъбов е завършил средното си образование в 29 СУ „Кузман Шапкарев“, София. Студент в Медицинския факултет на Медицинския университет – София.

(римантадин, амантадин) щамовете на грипен вирус А развиха сравнително бързо резистентни мутанти (с голям брой локуси във вирусния геном), които намалиха потенциала им от началото на XXI век като противовогрипни средства. С цел третиране на заболялите под действие на вирус А(Н5N1) птици (кокошки, пуйки, патици) стопаните на големи птичи ферми в Югоизточна Азия са закупили големи количества амантадин, чието приложение допринесе за развитието на изразена резистентност спрямо N2-блокери на грипния вирус. Фактически този акт на собствениците на птичи ферми бе истинско престъпление към човечеството. Макар и да бе установено развитие на резистентни мутанти срещу инхибитори на невраминидазата (оселтамивир, занамивир, перамивир и т.н.), този процес се оказва твърде бавен (и отличаващ се с единични локуси на замени) и използването на тези анти-вирули е водещо понастоящем в химиотерапията на грипа.

Относно причинителя на испанската болест, грипен вирус А(Н1N1), грип, довел до пандемия със смъртност 30 – 40 милиона (в Испания починали 6 милиона, у нас – 75 000 души) получените данни показаха, че произходът му не е резултат на реасортиране, а е най-вероятно птичи вирус със серия мутации.



Хипотетичен механизъм за разпространението на Азиатския грип от 1957 и на Хонгконгския грип от 1968

В началото на 2020 година човечеството бе напагнато от страшна по размери пандемия с причинител **коронавирус SARS-CoV-2**. Заболяването COVID-19 обхвана всички континенти. В края на април 2021 г. броят на заболялите достигна 150 530 783 а на починалите – 3 165 987; за България до април – 307 500 заболяли, 15 907 починали.

Генетичен произход на пандемичния грипен вирус А/Н1N1/2009			
PA РНК-полимераза субединица	птици	Сев. Америка	
PB1 РНК-полимераза субединица	човеци	Сев. Америка	
PB2 РНК-полимераза субединица	птици	Сев. Америка	
HA Хемалутинин	свински (H1)	Сев. Америка	
NP Нуклеопротеин	свински	Сев. Америка	
NA Невраминидаза	свински (H1)	Сев. Америка	
M Матричен протеин M1, M2	свински	Европа	
NSI Неструктурен протеин NSI	свински	Европа	
NEP = NEP (Nuclear Export Protein)	свински	Сев. Америка	

CCDF, Alberta, A/Columbia/67/0209 (27.04.2009)
Canada's National Microbiology Laboratory: A/Brisbane/02/2009 (05.02.2009)



Хиляди вирусни частици политат във въздуха след обикновено кихане на болен

Коронавирусите мутират три пъти по-слабо от грипните вируси, но те притежават свойството тяхната РНК да се рекомбинира с висока честота с други коронавируси, което позволява да се заразяват нови видове клетки и да „скачат“ към други биологични видове. Тези рекомбинации се срещат често в прилепите, носещи 61 вируса, известни с това, че заразяват човека. Този брой фактически е сведен до 12. Смята се, че коронавируса са се появили преди 10 хиляди години (според други автори – преди 300 милиона), като причинителят на COVID-19 преди 140 години първоначално е заразил прилепи, а преди 40 – 70 години е преминал в посредника панголин.

Интензивните проучвания за създаване химиотерапевтици срещу този вирус доведоха до няколко препарата, ефективни само при леките и умерени по тежест форми на заболяването. Наред с карантинните мерки, главно средство за борба с това заболяване се оказва създаването на ваксини. Проблемът е в развитието и циркулирането в световен мащаб на множество варианти на

SARS-CoV-2. Най-важният вариант бе идентифициран през септември 2020 г. във Великобритания, означен като B.1.1.7, разпространен с голям брой мутации. Друг вариант, намерен в Южна Африка, бе означен като B.1.351, появил се независимо от британския. Наскоро вариант под името P.1 бе разпространен в Бразилия. От декември някои страни, включително САЩ, съобщиха за мутации в английския вариант B.1.1.7 в рецептор-свърз-

ващата област на спайк-протеина S в позиция 501, в която аспарагин е заместен от тирозин – мутация, означена като N501Y. По-късно бяха отбелязани повече мутации в този вариант, като делецията 69/70, водеща до конформационна промяна в протеин S; наред с това и мутацията P681H, локализирана близо до позицията на разрязване на фурина S1/S2, място с висока вариабилност при коронавируса. Доказано бе, че този вариант е свързан с повишена трансмисия. През януари 2021 г. британски учени съобщиха, че вариант B.1.1.7 може да се свърже с повишен риск от леталност. При южноафриканския вариант (W.1.351) бяха установени множество мутации в протеин S, включващи K417N, E484K, N501Y. Този вариант не съдържа делецията 69/70 в английския вариант. Освен това, регистрирана бе и E484K, ключова мутация, придаваща резистентност към антитела, неутрализиращи SARS-CoV-2, което ограничава лечебната ефикасност на терапията с моноклонални антитела. Бразилският вариант P.1 има три мутации, локализирани в S протеина (K417T, E484K и N501Y). Установено

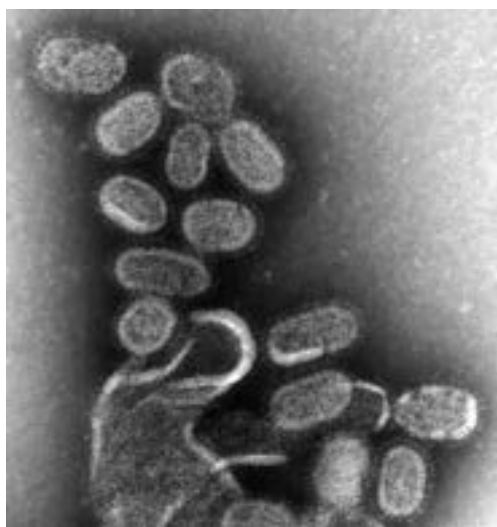
е, че мутациите в Р.1 варианта могат да променят трансмисивността и антигенния профил, а следователно увреждат способността на антителата след естествена инфекция или ваксиниране да разпознават и неутрализират вируса.

Напоследък се появи индийският вариант на SARS-CoV-2, известен като B.1.617. Той е с 8 мутации в S-протеина, сред които двойка ключови (E484Q и E484K), налични в южноафриканския и бразилския варианти. Отличава се с по-голяма трансмисивност, свързана с мутация L452R. Антителата са по-малко ефективни срещу варианта, но ваксините срещу COVID-19 предпазват в 97%. Вирусът не води до по-тежко протичане на заболяванията, но прекаралите COVID-19 могат отново лесно да се заразят. Тези повторни инфекции може би са причината за вълната от заразявания в Индия.

Ролята на вирусната изменчивост особено силно се проявява при **ентеро-вирусите**, род на пикорнавируси, включващ риновируси. При тях е доказана най-високата изменчивост, позната в природата – мутационна степен 10^{-3} – 10^{-4} . Това се дължи на обстоятелството, че вирусната РНК-зависима РНК-полимераза функционира като необичайна за клетката гостоприемник (в която действат ДНК-зависими РНК-полимерази), което води до твърде чести грешки. Установено е, че всеки вирусен репликационен цикъл (продължаващ 6 – 8 часа) завършва с една мутация. В резултат на това вирусната популация е съставена от милиарди псевдо (квази) видове. На това се дължи фактът, че в една и съща територия по едно и също време един и същ ентеровирус причинява инфекции с различни клинични картини. Наред с това клинически непроявените ентеро-

Фенотипни характеристики на дизоксарилови мутанти на Коксакивирус В1

Dioxaril мутанти	MIC50 (μM)	Плаков диаметър (mm)	Форма на плаките ETΔ = 3 logs	Устойчивост при t 50°C (min)	Патогенност за мишки
CVB1/SOF (диз) 30μM/клетки FL (DIS-чувствителен)	0.84	0.9 ± 0.3	кръгла	31	нормална
CVB1/RES- 30μM/клетки FL (DIS-резистентен)	>30.0	1.9 ± 0.1*	неправилна	7	повишена
CVB1/SOF (диз) 25mg/kg/мишка (DIS-чувствителен)	0.5-1.4	0.9 ± 0.3	кръгла	26	нормална
CVB1/RES- 25mg/kg/мишка (DIS-резистентен)	>40.0	1.9 ± 0.1*	неправилна	13	повишена
CVB1/DEP- 30μM/клетки FL (DIS-зависим)	-	1.9 ± 0.1	неправилна	23	нормална



Микрофотография на вирусен грип, снимка с електронен микроскоп с увеличение 100 хил. пъти. Cynthia Goldsmith

вирусни инфекции са над 80%, с което се затруднява епидемиологичната оценка, диагностиката и терапията на заболяванията. Особено силно негативно влияе псевдовидовият характер на ентеровирусната популация върху създаването на химиотерапия на ентеровирусите – основен подход за етиотропна терапия на ентеровирусните инфекции. Засега изобщо не е създаден клинически ефективен антивирал при тези инфекции. Това се дължи на почти експресното развитие на резистентност спрямо всяко вещество, показало инхибиращ ефект върху ентеровирусната репликация в експерименти *in vitro* (в клетъчни култури). Лекарствената резистентност е снижена или липсваща към всеки инхибитор на репликацията. Ентеровирусите проявяват значително високи нива на генетични варианти, свързани с хетерогенност на генетично и фенотипно нива, създадени чрез мутации и рекомбинации. Лекарствената резистентност е феноти-

пен белег, определен от генотипа и генотипните мутации във вирусния протеин – мишена на даден инхибитор. От няколко хиляди инхибитори, доказани в експерименти *in vitro*, по-малко от 20 се оказаха активни в опити *in vivo* и нито един в изследвания на хора (двойни слепи изпитания). Междувременно бе установено, че лекарствено-резистентните ентеровирусни мутанти притежават промени в своя фенотип, включително повишена патогенност *in vivo*. Доказано бе развитие и на лекарствено зависими мутанти.

Намерена бе лекарствена резистентност към гванидин, 2-алфа-хидрокси-бензил-бензимидазол (HBB), арилгон, гизоксарил, оксоглауцин и много други ентеровирусни инхибитори. Нещо повече, развитието на лекарствена резистентност бе обявено за изискване дадено вещество да се счита за специфичен инхибитор на вирусната репликация. За създаване на ефективна химиотерапия на ентеровирусните инфекции се премина към замяна на монотерапията с комбинирана терапия (прилагане на комбинация от ентеровирусни инхибитори синергисти.

Друг важен проблем е изследването на мутациите на причинителя на световната пандемия от СПИН – HIV. Установен бе произходът на този вирус, преминал в човешката популация към 1910 г. в резултат на преход чрез серия мутации от маймунския имунодефицитен вирус (SIV) в шимпанзета от някои страни на Западна Централна Африка (Камерун, Сенегал, Кот д'Ивоар). HIV се отличава с твърде високата си генетична изменчивост, свързана с бързия репликативен цикъл с мутационна степен 3×10^{-5} на нуклеотидна база за репликационен цикъл и рекомбиногенни свойства на обратната транскриптаза. На тази основа се

генерират множество мутанти на вируса у всеки заразен още в деня на заразяването. Формира се хибриден вирион, който инфектира нова клетка, в която се реплицира. Обратната транскриптаза, скачайки между формираните две рекомбинантни форми, генерира новосинтезирана ретровирусна ДНК матрица, представляваща рекомбинант между два родителски генома. Идентифицирани са три групи HIV-1, различаващи се по региона *env*: M, N и O с различна географска локализация. Ко-инфекцията с различни субтипове е основа за циркулиране на голям брой рекомбинантни форми. Тази вариабилност е главният проблем на изследванията за разработването на ефективни анти-HIV химиотерапевтици. Интензивната работа в тази област доведе до наличието понастоящем на над 25 милиона заразени, но неболедуващи от СПИН.

Сериозно постижение е разработването през последните 5 – 6 години на серия високоактивни химиотерапевтици срещу вируса на **хепатит С**, позволяващи 96% ефективност на лечението на това тежко и широко разпространено заболяване. Налице е известно изоставане в работата по създаване на клинически активни антивирали спрямо вируса на **хепатит В**.

Междувременно човечеството бе заплашено от **арбовирусни** епидемии с

преносвачи комари и кърлежи, главно в страни в екваториалната зона и тропиците – тога(алфа) вирусите Чикунгуния и Рос Ривър, флавивирусите денга, Зика, Западен Нил и др., буня(ханта)вируса Конго-Кримска хеморагична треска, аренавируса Ласса, както и от **филовируса Ебола**, от **парамиксовирусите Нипа и Хендра**. Анализът на причинителите и най-вече на техната изменчивост е основата за разработване на ефективни химиотерапевтици и ваксинални препарати.

Битката между вирусите и човека е жестока и с променлив успех за човечеството. С ваксина бе ликвидирана вариолата, създадени бяха ефективни ваксини срещу полиомиелита, ротавируси, морбили, паротит, папиломавируси, за профилактика и лечение на беса, и др. Разработени и внедрени в клиничната практика бяха антивиралите срещу грип (оселтамивир, занамивир и др.), херпес симплекс (ацикловир и др.), хепатит С, вариола и треската Ласса (за армията на САЩ) и др. В последната година сме свидетели на сражението със SARS-CoV-2 – в него са налице успехи, но засега оптимистичният край се вижда в хоризонта от поне още една година. Надеждата ни е в способностите на човека/науката да победи вируса на пандемията COVID-19. Дано цената, която трябва да платим, е поносима! ■