

Г. Х. ДРАМПЯН, С. Г. БАДАЛОВ

ДАННЫЕ О ФОРМИРОВАНИИ КРИСТАЛЛОПОДОБНЫХ СТРУКТУР У РАЗЛИЧНЫХ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА И НАСЕКОМЫХ

Проведено сравнительное морфологическое изучение внутриклеточных кристаллоподобных структур, формирующихся в ходе онтогенеза у различных вирусов человека и насекомых.

Установлено, что у всех изучаемых вирусов (аденовирус, вирус герпеса, вирусы полиодрога и гранулеза) кристаллоподобные структуры образованы из упорядоченно расположенных нуклеокапсидов.

Рассматривается возможный механизм сборки кристаллоподобного образования из отдельных вирусных единиц (нуклеокапсидов).

Вирусам, поражающим многочисленных представителей растительного и животного мира, от одноклеточных организмов до человека, присуще большое разнообразие биологических свойств. Каждому вирусу или «группе» близкостоящих вирусов (пикорнавирусы, аденовирусы, ретровирусы насекомых, вирусы группы ВТМ и т. д.) свойственны характерные морфологические, генетические, физиологические и другие особенности, которые позволяют с убедительной достоверностью дифференцировать их друг от друга. Однако между представителями различных групп вирусов, поражающих как близкие, так и далекостоящие в эволюционном отношении типа живых организмов, имеется и значительное сходство, помимо сходства по общим для всех вирусов кардинальным свойствам, отличающим вирусы от других живых существ и определяющим их сущность.

Вспомним о структурном и морфологическом сходстве между некоторыми миксовирусами, поражающими человека и позвоночных животных (вирусы везикулярного стоматита и гриппа) и рядом вирусов, поражающих растения и насекомых (вирусы гомфрены, желтой карликовости картофеля, подорожника, бронзовости томатов, вирус сигма дрозофиллы) [5—13].

Примером исключительного сходства далекостоящих вирусов являются вирусы оспы, поражающие позвоночных животных и человека, и оспоподобные вирусы, поражающие некоторых насекомых [4]. У этих двух групп вирусов сходство не ограничивается рамками структурной и морфологической общности. Онтогенез, который проходят они в клетках специфических хозяев, почти одинаков как в целом, так и во многих важнейших деталях. Формирование в ходе онтогенеза виропластов, вирусных включений, суперкапсидальной оболочки—пеплоса, кристаллоподобных структур, состоящих из многих десятков и тысяч вирионов, и про-

явление некоторых других важных свойств и признаков характерно многим вирусам, поражающим человека, животных, растения, вирусам, имеющим как спиральный, так и кубический тип симметрии [1, 2]. Подобные факты очень важны, ибо они наряду со многими другими являются важным доказательством органической целостности всех вирусов, их единого происхождения и общей эволюционной истории.

В данном сообщении нам бы хотелось остановиться на одном из указанных свойств, в частности на формировании вирусами внутриклеточных кристаллоподобных структур.

Известно, что некоторые спиральные и сферические вирусы могут образовывать в клетке в ходе своего онтогенеза кристаллоподобные образования. Указанным свойством обладают вирусы человека, позвоночных и беспозвоночных животных, растений и даже некоторых бактерий [1—3, 12]. Ввиду этого представляло интерес выявить и в сравнительном аспекте изучить подобные образования при морфогенезе различных далекостоящих вирусов. В качестве моделей для такого исследования нами были взяты адено- и герпетический вирусы человека и вирусы полиэдроза и гранулеза насекомых. Следует указать, что относительно возможности «кристаллообразования» у двух последних вирусов, поражающих насекомых, сообщений в литературе не было (кристаллоподобная упаковка у вирусов насекомых известна лишь у вирусов с кубическим типом симметрии [3]).

Материал и методика. Гусениц американской белой бабочки (*Hyphantria cunea* Dugig) разделяльно инфицировали через корм 0,2 мл суспензии вируса полиэдроза и таким же количеством вируса гранулеза. Титр каждого из вирусов составлял $2,3 \times 10^5$ полиэдров (гранул) в 1 мл. На 5-ые и 7-ые сутки после заражения гусениц из гиподермы жирового тела и трахеального матрикса каждой особи брали кусочки, которые помещали в глютаральдегид на 60 мин, затем проводили дофиксацию по Шестранду в течение двух часов; кусочки обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в метакрилаты. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-4800, окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-6.

Перевиваемую линию клеток HeLa выращивали в пробирках Лейтона. После получения монослоя клеток в одни пробирки вносили аденовирусы типов 3, 7, 8 (раздельно), в другие—вирус простого герпеса, штамм «К». Титр вирусов составлял: аденовирусы — 3, 7, 8, 10^5 цпд₅₀ в 0,1 мл, вирус простого герпеса— 10^6 цпд₅₀ в 0,1 мл.

Через 10, 24, 48, 72 часа после заражения культуральную жидкость сливали и клетки обрабатывали глютаральдегидом 30 мин, фиксатором Шестранда 60 мин. Дальнейший процесс обработки материала протекал как у первых двух вирусов.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования показали, что в процессе онтогенеза все изучаемые вирусы формируют в клетках кристаллоподобные образования. Рассмотрим этот процесс у каждого из четырех вирусов. Начнем с вирусов гранулеза и полиэдроза, у которых этот процесс имеет много общих черт.

В определенный период онтогенеза указанных вирусов в цитоплазме (гранулез) и ядре (полиэдроз) пораженных клеток формируется диффузнораспологающаяся зернистая масса, состоящая из тонких осмню-

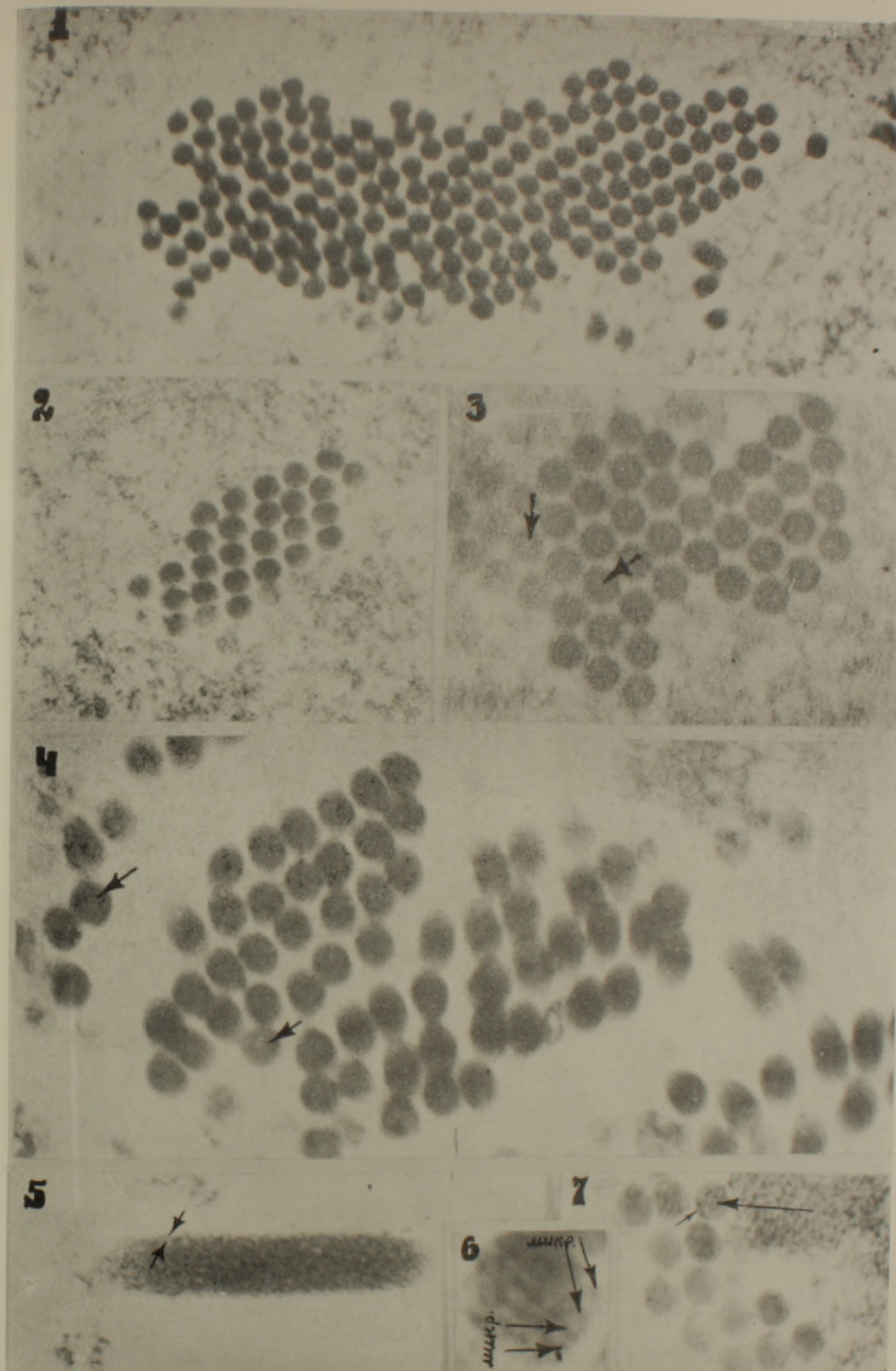


Рис. 1—3. Внутриклеточные кристаллоподобные скопления вируса полиэдроза (увл. $\times 103000$, $\times 127000$, $\times 165000$). Рис 4. Внеклеточное кристаллоподобное скопление вируса полиэдроза (увл. $\times 210000$). Рис 5—7. Продольное и поперечное сечения нуклеокапсидов вируса полиэдроза (увл. $\times 297000$, $\times 578000$, $\times 170000$).

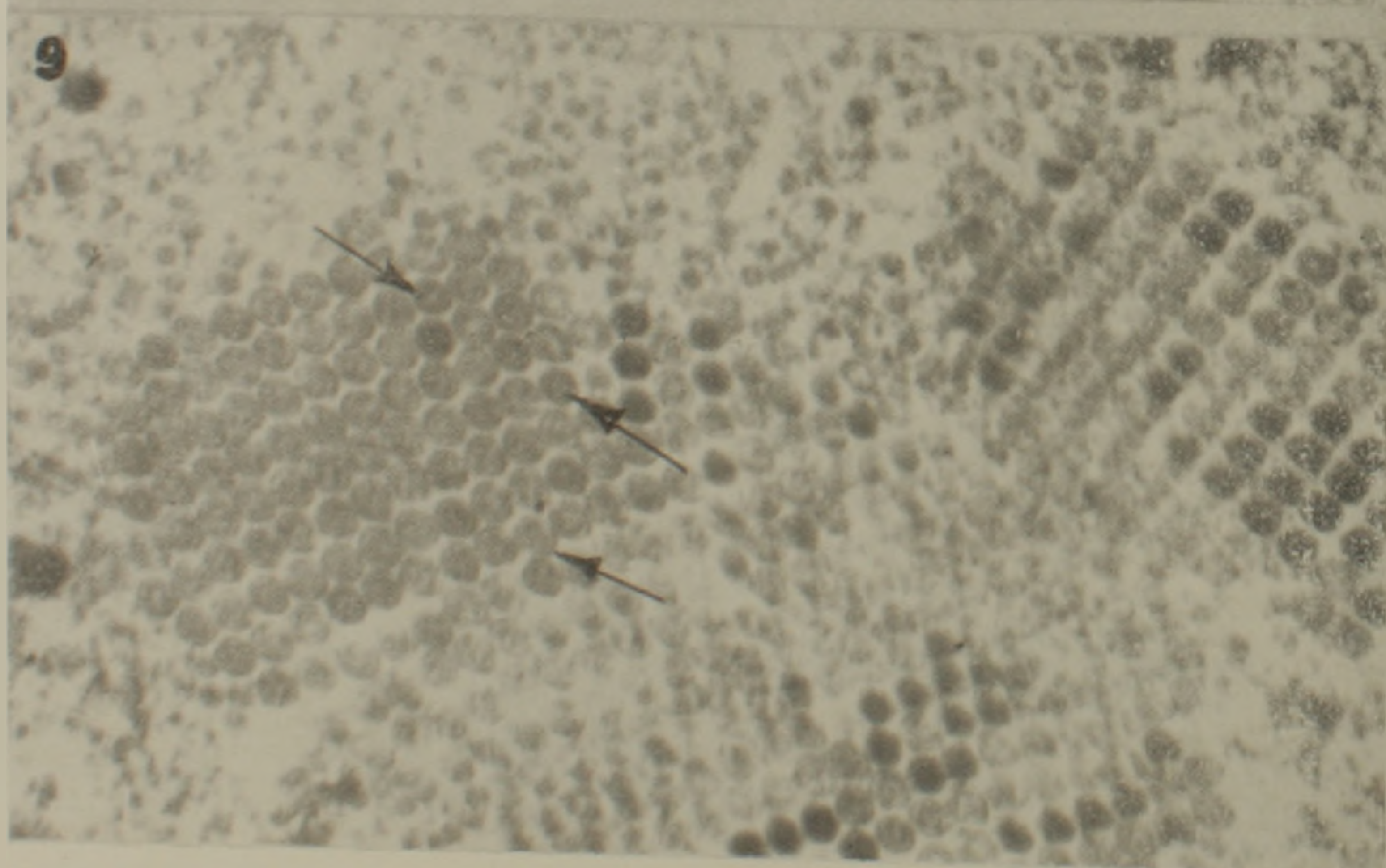
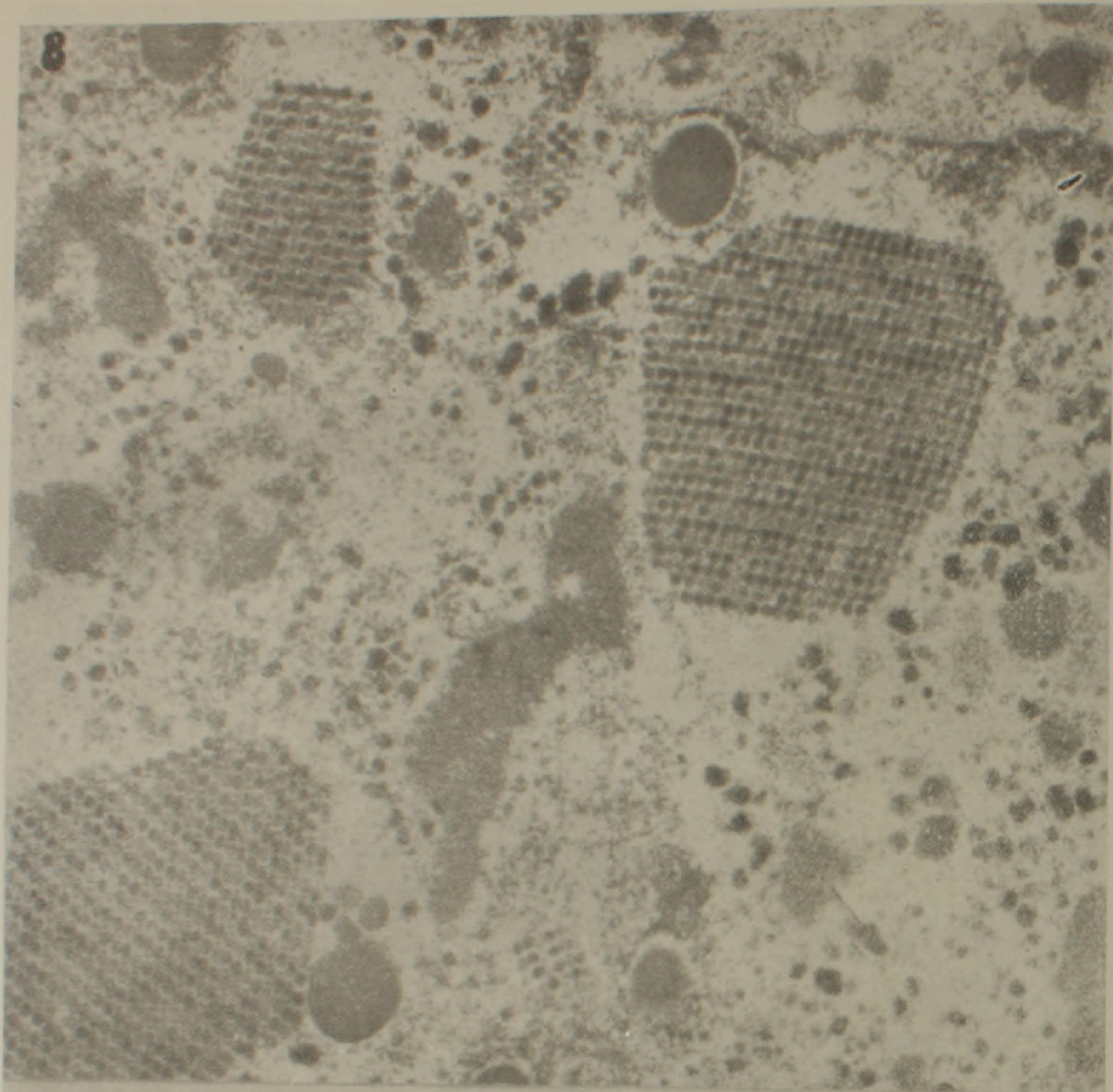


Рис. 8 Внутриклеточные кристаллоподобные скопления аденовируса (увл. $\times 208600$) Рис. 9 Сечения нуклеокапсидов (вирионов) аденовируса (увл. $\times 60000$).

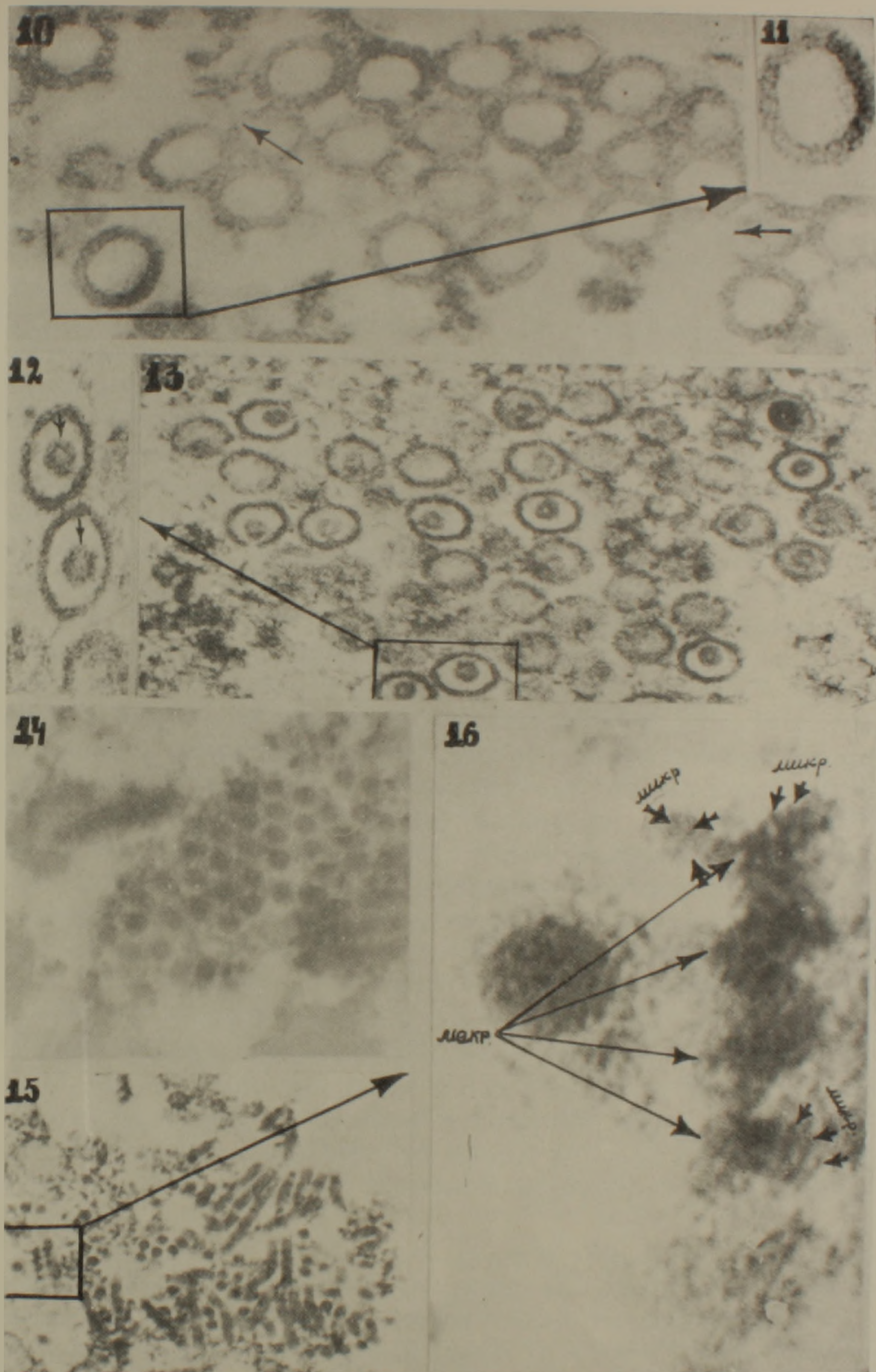


Рис. 10, 13. Внутриклеточные кристаллоподобные скопления вируса герпеса (увл. $\times 135000$, $\times 90000$). Рис. 11, 12. Сечения капсида и нуклеокапсидов вируса герпеса (увл. $\times 210000$, $\times 150000$). Рис. 14. Внутриклеточное кристаллоподобное скопление вируса гранулеза (увл. $\times 78000$). Рис. 15. Внеклеточное кристаллоподобное скопление вируса гранулеза (увл. $\times 39000$). Рис. 16. Продольное и поперечное сечения нуклеокапсида вируса гранулеза (увл. $\times 440000$).

фильных фибрилл и мелких гранул (виропласты). В зоне виропластов вирусов полиэдро́за и грануле́за происходит синтез-репликация их геномов и последующее формирование нуклеокапсидов (нуклеопротеид с так называемой «интимной мембраной» — капсидом). Анатомически нуклеокапсиды вирусов полиэдро́за и грануле́за почти не отличаются. Различие между ними существует лишь в размерах (нуклеокапсид полиэдро́за ~ 300 нм $\times \sim 45$ нм, грануле́за ~ 220 нм $\times \sim 35$ нм). Принцип организации нуклеокапсидов этих двух вирусов таков: синтезированная нить ДНП в процессе формирования вируса дважды закручивается, образуя вначале микроспираль (рис. 6, 16), которая, вторично закрутившись вокруг своей длинной оси, образует короткую, имеющую лишь несколько (от 4 до 7) витков, макроспираль (рис. 16). Одновременно вокруг макроспирали формируется и капсид (рис. 5). Макроспираль, окруженная капсидом, при поперечном рассечении напоминает диск с отверстием в центре (рис. 3, 4, 7). Диаметр отверстия нуклеокапсидов у обоих вирусов достигает $150 \text{ \AA}$. При определенных углах поперечно рассеченного нуклеокапсида на поверхности диска выявляются звенья микроспирали (рис. 6). В клетках нуклеокапсиды встречаются как «пучками» — в виде маленьких кристаллов (в основном при полиэдро́зе), так и в отдельности (в основном при грануле́зе). Это свойство напрямую связано с характером морфологии вирионов этих вирусов (у полиэдро́за одна вирусная оболочка окружает порой до 15 нуклеокапсидов, при грануле́зе вирионы содержат один нуклеокапсид). Однако в большинстве клеток (особенно при полиэдро́зе) они собираются в большие кристаллоподобные скопления (рис. 1—3, 14), которые содержат в своем составе от 30 до 300 нуклеокапсидов. На ультратонких срезах скопления нуклеокапсидов выявляются как в поперечном, так и в продольном рассечениях. Следует отметить, что нуклеокапсиды вирусов грануле́за и полиэдро́за после приобретения трехслойной мембраны кристаллоподобных образований уже не формируют.

После разрушения клеток кристаллоподобные образования, оказавшись в межклеточном пространстве, постепенно распадаются (особенно при грануле́зе) (рис. 15), но могут значительное время и сохраняться (рис. 4). Любопытно отметить, что процесс распада в первую очередь заключается в потере нуклеокапсидами ориентации друг относительно друга.

При морфогенезе вируса герпеса в ядрах клеток среди мелкогранулярного хроматина выявляются осмиофильные скопления, состоящие из фибрилл и гранул (виропласт). Из указанного материала после репликации генома вируса формируется капсид ($D \sim 900 \text{ \AA}$), выявляющийся на ультратонких срезах в виде незамкнутой кольцеобразной структуры (рис. 10). После окончательного формирования капсида (рис. 11) внутри замкнутой полости наблюдается формирование нуклеоида (рис. 13), развитие которого происходит постепенно. Вначале он примыкает к капсиду и занимает маленькую площадь, но по мере развития увеличивается,

достигая $700 \text{ \AA}$, и занимает центральное место внутри капсида (рис. 12). На указанных двух стадиях морфогенеза вируса герпеса сформировавшиеся нуклеокапсиды (рис. 11, 12) нередко собираются в кристаллообразные скопления (рис. 10, 13). В плоскости одного ультратонкого среза число их в скоплении достигает 70 единиц. Важно отметить, что роль капсида в формировании кристаллоподобных фигур несомненна, ибо фигуры возникают и из «пустых» капсидов, и из «полных», но не возникают из зрелых вирионов (нуклеокапсид с дополнительной оболочкой).

Наконец, о кристаллоподобных скоплениях, возникающих при морфогенезе аденовируса*. Эти скопления являются широко известными и, по-видимому, одними из самых классических и крупных (по числу вирионов) среди подобных образований. В состав кристаллоподобных образований, формирующихся при морфогенезе аденовируса входят, как и у трех предыдущих вирусов, нуклеокапсиды. Однако в данном случае, нуклеокапсид не является провирионом как у трех вышеописанных вирусов. Сформировавшийся аденовирусный нуклеокапсид—это завершивший свое развитие вирион. Число таких вирионов в кристаллоподобном скоплении может достигнуть нескольких тысяч и многих сотен в плоскости одного ультратонкого среза. Если ультратонкий срез проходит через центр вириона, то аденовирус имеет вид правильного шестиугольника размером $500 \times 600 \text{ \AA}$ (рис. 9). В центре вириона расположен плотный нуклеонид диаметром $450 \text{ \AA}$, покрытый снаружи белковой оболочкой—капсидом, толщиной $60 \text{ \AA}$ (рис. 9).

Итак, мы рассмотрели четыре разных далекостоящих вируса, схожих тем, что в процессе онтогенеза формируют в клетках вирусные кристаллоподобные скопления. Можно ли считать формирование кристаллоподобных фигур случайным и носящим лишь «механический» характер, если нет, то каковы возможные причины и механизмы их образования.

Известно, что в реализации разнообразных функций вируса важную роль играют активные химические группы молекул белка, расположенные на поверхности капсида или суперкапсида. Среди этих групп, вероятно, есть и такие, которые могут взаимодействовать с аналогичными участками других вирусных единиц (нуклеокапсидов, вирионов). Причем взаимодействие это может зависеть не только от расположения и специфичности химических групп, но и от конфигурации молекул белка, т. е. взаимодействие вирусных единиц (нуклеокапсидов, вирионов) возможно тогда, когда между определенными участками их поверхностей имеется стереохимическое соответствие. Вероятно, в результате такого взаимодействия и происходит «полимеризация» нуклеокапсидов в «кристаллы». Причем, не исключено, что при этом нуклеокапсиды могут и несколько изменить свою ориентацию в окружающей среде. В нашем конкретном случае возможно, что, такое изменение ориентации имеет место у всех

* Морфогенез аденовирусов типа 3, 7, 8 между собой ничем существенным не отличается.

вирусов, но оно может быть более необходимо анизометрическим нуклеокапсидам вирусов полиэдро́за и грануле́за, тогда как сферическая форма аденови́руса и герпеса в указанном процессе, вероятно, им благоприятствует.

Разумеется, вышесказанное является лишь предположением, однако какой бы характер ни носило образование кристаллоподобных скоплений, маловероятно, что оно является лишь следствием случайного механического взаимодействия вирусных единиц. Кстати, на это указывает и тот факт, что с приобретением новых мембран вирусы полиэдро́за, грануле́за и герпеса перестают формировать кристаллоподобные образования. А ведь поверхность этих мембран также содержит активные химические группы белка. К тому же, если даже исключить роль химического взаимодействия, то нельзя забывать, что сама форма «вирусной единицы» не претерпевает существенных изменений и не теряет своей симметричности, поэтому, если сборка носит механический характер, то она возможна и в этом новом случае. Таким образом, более вероятно, что феномен кристаллообразования носит осмысленный характер. В чем же может заключаться смысл такого упорядоченного скопления вирусных единиц. Ответить на этот вопрос с достоверной точностью пока невозможно.

На наш взгляд, одной из возможных причин может являться «стремление» вируса обособиться, приобрести групповую автономию, позволяющую более надежно сохранять вид и его генетическую информацию. Как видим, те же нуклеокапсиды после приобретения индивидуальной автономности (трехслойной оболочки) в какой-либо иной форме автономии уже не нуждаются.

Резюмируя вышесказанное, можно сделать следующие выводы.

Различные вирусы, поражающие далекие в эволюционном отношении живые организмы, обладают общим свойством—формируют в клетках в ходе онтогенеза кристаллоподобные образования, которые у всех рассматриваемых вирусов состоят из упорядоченно расположенных нуклеокапсидов.

Ни один из вирусов не формирует этих образований из вирионов или каких-либо других вирусных форм, кроме нуклеокапсидов.

Феномен кристаллообразования свойствен как вирусам со спиральной симметрией, так и с кубической; как внутриядерным, так и цитоплазматическим вирусам; как сложным (полиэдроз, гранулез, герпес), так и простым (аденовирус).

Все это позволяет заключить, что указанное свойство является одним из важных и общих свойств, играющих определенную роль не только в онтогенезе, но, вероятно, и в филогенезе вирусов.

Գ. Կ. ԳՐԱԾՓՅԱՆ, Ս. Գ. ԲԱԼԱՇՈՎ

ՏՎՅԱԼՆԵՐ ԸՆԴՈՒՄԻ ԵՎ ՄԻՋԱՏՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ՎԻՐՈՒՄՆԵՐԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ
ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ ԿԱԶՄԱՎՈՐՎՈՂ ԲՅՈՒՐԵՂԱՆՄԱՆ ԳՈՅԱՑՈՒՄՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է բյուրեղանման գոյացումների կազմավորումը էվոլյուցիոն տեսակետից հեռու կանգնած որոշ վիրուսների դադարացման ընթացքում: Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ այդ պրոցեսը նույնիսկ հեռու կանգնած վիրուսների մոտ (ադենովիրուսի, հերպեսի, պոլիէդրոզի, գրանուլյոզի) ունի բավական ընդհանուր սկզբունքային պահեր: Դրանք են՝ բյուրեղանման գոյացումների կառուցվածքային բաղադրամասերը, որոնք ընդհանուր են բոլոր ուսումնասիրվող վիրուսների համար և իրենցից ներկայացնում են նուկլեոկապսիդներ և երկրորդը, որ բյուրեղանման գոյացումների ներսում նուկլեոկապսիդները տեղավորված են մեկը մյուսի նկատմամբ խիստ զուգաչափ: Այստեղ կարևորն այն է, որ այդ գոյացումները չեն կազմավորվում, երբ նուկլեոկապսիդները ձևորեն բերում են մեկ լրացուցիչ թաղանթ (սուպերկապսիդային):

Ադենովիրուսի, հերպեսի, պոլիէդրոզի և գրանուլյոզի վիրուսների նուկլեոկապսիդների անատոմիայի ուսումնասիրությունից պարզվեց նրանց ունեցած բավական բարդ կառուցվածքը: Նվ եթե առաջին երկուսի կառուցվածքը նկարագրված էր (դրականությամբ), ապա պոլիէդրոզի և գրանուլյոզի նուկլեոկապսիդների կազմավորումը չէր լուսաբանված:

Մեր ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ երկու վիրուսների նուկլեոկապսիդներն էլ ունեն կազմավորման ընդհանուր սկզբունք: ԴՆԹ-ի թելը կրկնակի ոլորված է իր իսկ կենտրոնական սոնիի շուրջը և այդ վիճակում շրջապատված կապսիդով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авицян А. А., Быковский А. Ф. Атлас анатомии и онтогенеза вирусов человека и животных. 148, 149, 172, 248, 249, 254, М., 1970.
2. Лурия С., Даркелл Дж. Общая вирусология. 167, 173, 298, 346, М., 1970.
3. Тарасевич Л. М. Изв. АН СССР (серия биологическая), 5, 696, 1973.
4. Devauchelle G., Bergoin M., Vagoc C. J. Ultrastruct. Res., 37, 301, 1971.
5. Hitchborn J. H., Hills G. J., Hull R. Virology, 28, 768, 1966.
6. Hummeler K., Koprowski H., Wiktor T. J. Virology, 1, 152, 1967.
7. Van Kammen A., Henstra S. Virology, 30, 574, 1966.
8. Kitajima E. W., Costa A. S. Virology, 29, 523, 1966.
9. MacLeod R. Virology, 34, 771, 1968.
10. Milne R. G. Sci. Progr. (Oxford), 55, 203, 1967.
11. Simpson R., Hauser R. E. Virology, 29, 654, 1966.
12. Wildy P., Watson D. H. Cold Spring Harbor Symp., 27, 25, 1962.
13. Wolf K. Advances Virus Res., 12, 36, 1966.