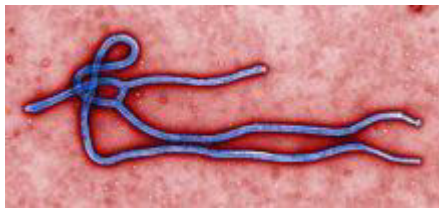


Борьба с наномашинной: Вирус Эбола (17 баллов)



Непрекращающаяся эпидемия болезни, вызываемой вирусом Эбола (ВЭ)*, сейчас считается одной из главных мировых угроз. «Наномашина» этого вируса устроена довольно просто, но вызывает тяжелую и часто смертельную болезнь, от которой пока нет официальных вакцин и лекарств.

* Род *Ebolavirus* из семейства *филовирюсов* делится на пять видов, человека поражают только 4 из них; нынешняя эпидемия вызвана одним из этих четырех – вирусом Эбола (вирусом Эбола Заир).

Общие вопросы.

1. *Каков жизненный цикл ВЭ в природе? Каким образом он попадает к людям? Может ли штамм, вызвавший текущую эпидемию, будучи завезенным в нашу страну, «обосноваться» и вызывать повторные вспышки уже после полного окончания текущей эпидемии? (1,5 балла)*

Тяжесть протекания болезни и высокая смертность для человека создают впечатление, что Природа специально «выводила» максимально опасный для людей вирус.

2. *Так ли это? Объясните, откуда в природе берутся новые высокосмертельные для человека вирусы? Как вы думаете, повышается или понижается смертность ВЭ в ходе текущей эпидемии? Будущие вспышки ВЭ будут более или менее смертельными для человека? (2 балла)*

Анализ геномов Эболавирусов показывает, что человечество живет с ними рядом в течение как минимум тысячелетий, однако об этих вирусах стало известно лишь в 70-х годах прошлого века.

3. *Угрожали ли раньше Эболавирусы человечеству отдельными вспышками или эпидемиями? Участились ли за последние полвека вспышки Эболавирусов? Действительно ли повысилась связанная с ними опасность? Связано ли это с эволюцией вирусов? Поясните. (2,5 балла)*

Диагностика.

Для борьбы с эпидемией важно уметь быстро выявлять и изолировать заболевших. На начальном этапе симптомы (лихорадка, головная боль) могут напоминать симптомы распространенных, но значительно менее опасных заболеваний.

4. *Вкратце перечислите, каковы основные «наноследы» присутствия ВЭ в организме? Как они выявляются? (1 балл)*

Против наномашинны.

Чтобы понять какие уязвимые места есть в «наномашине» вируса, надо узнать, как она устроена и как работает.

5. Вкратце опишите, как устроен вирус Эбола и каковы основные стадии его жизненного цикла при попадании вовнутрь организма. Какие основные мишени (и на какой стадии жизненного цикла) для атаки вируса можно выделить? Поясните, на какой стадии жизненного цикла они уязвимы. (2 балла)

Несмотря на огромные потенциальные возможности нанотехнологий, на текущий момент при экспериментальном лечении больных ВЭ людей в качестве действующих веществ широко используются лишь несколько типов нанообъектов: **РНК** и **белки**.

6. Приведите примеры таких лекарств. Поясните, как они работают, если их принципы действия были «подсмотренные» у природы. Какие нанообъекты могут быть использованы для доставки к цели этих лекарств? (3 балла)

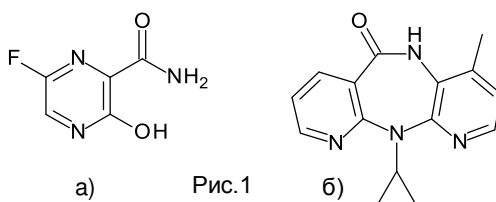
7. Как вы оцениваете эффективность предложенного в Нигерии нового экспериментального метода борьбы с ВЭ при помощи препарата **Nano Silver**? (1 балл)

В странах Африки, где бушует эпидемия, на черном рынке пользуется спросом кровь переболевших ВЭ людей.

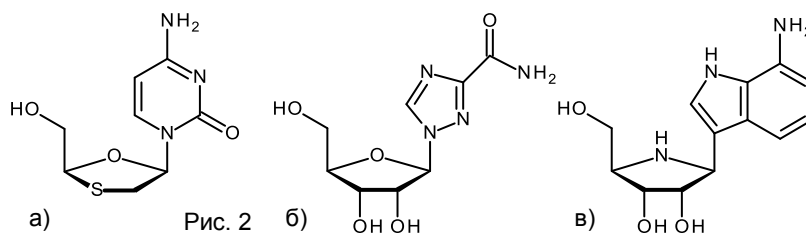
8. Может ли такая кровь использоваться для лечения ВЭ? Вкратце опишите, чем может быть опасно переливание такой крови. (1 балл)

Заманчиво, если бы для лечения ВЭ подошли какие-нибудь из многочисленных противовирусных препаратов, которые уже широко используются в медицинской практике.

9. Какое из двух лекарств – фавипиравир (рис. 1а, действует против вируса гриппа) или невиртапин (рис. 1б, против ВИЧ) – вы бы в первую очередь проверили на активность против вируса Эбола? Почему? (1 балл)



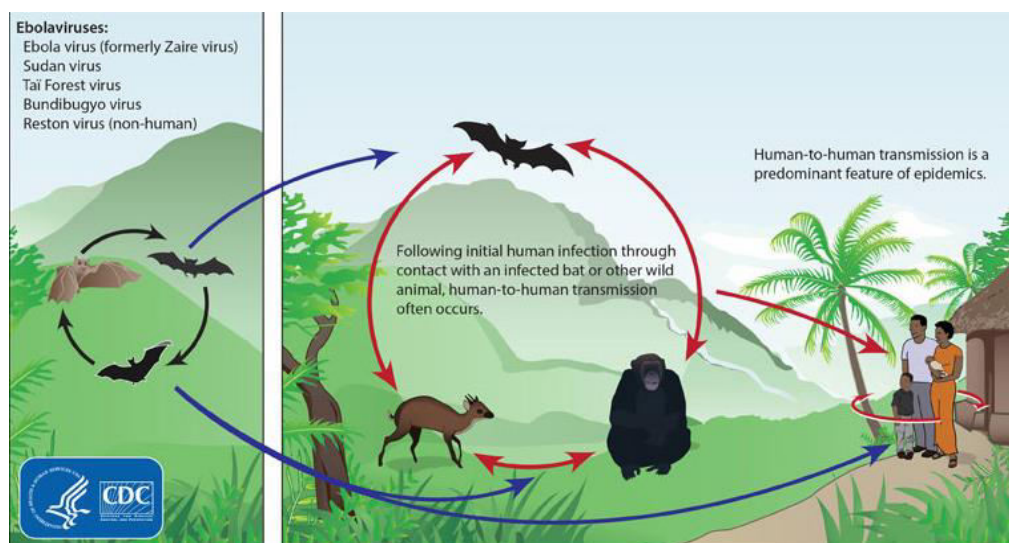
На рисунке 2 изображено несколько химических соединений, проявляющих активность против ВЭ в живой клетке:



10. Основываясь на структурах этих лекарств, предположите, что они могут «поломать» в жизненном цикле вируса. (2 балла)

Ответ.

1. Каков жизненный цикл ВЭ в природе? Каким образом он попадает к людям? Может ли штамм, вызвавший текущую эпидемию, будучи завезенным в нашу страну, «обосноваться» и вызывать повторные вспышки уже после полного окончания текущей эпидемии? (1,5 балла)



Природный резервуар ВЭ – зоонозный, что означает, что вирус приобретает человеком от животных. Полагают, что естественными хозяевами вируса Эбола являются проживающие в тропических дождевых лесах питающиеся фруктами летучие мыши семейства Pteropodidae, среди которых постоянно циркулирует вирус. Время от времени от летучих мышей могут заразиться другие животные, включая человека, среди которых может вспыхнуть эпидемия. ВЭ попадает в популяцию человека в результате тесного контакта с кровью, выделениями, органами или иными жидкостями организма инфицированных животных, например шимпанзе, горилл, фруктовых летучих мышей, обезьян, лесных антилоп и дикобразов, обнаруженных мертвыми или больными. После этого вирус начинает передаваться среди людей.

В перерывах между вспышками среди людей вирус полностью отсутствует. Следовательно, чтобы обосноваться в другом месте после полного окончания текущей эпидемии, вирусу необходимо создать новый зоонозный резервуар. Это маловероятно, поскольку, необходима цепочка маловероятных событий:

а) чтобы вирус был к нам завезен и не был своевременно локализован (этому препятствует существенно более высокий уровень медицины по сравнению с Африкой);

в) чтобы завезенный вирус (пока вспышку не ликвидировали) успел передаться от человека к животным;

г) чтобы вирус начал передаваться между животными, и вспышка среди них не была скоротечной;

д) чтобы для вируса нашелся подходящий новый хозяин, в популяции которого вирус сможет длительно существовать (лучше всего могут подойти летучие мыши).

Поскольку, очевидно, летучие мыши редко контактируют напрямую с людьми или с домашними животными (оставаясь при этом живыми), вероятность передачи к ним вируса от больного человека непосредственно или, например, через заболевших от человека домашних животных крайне мала. Также эту возможность уменьшает наша холодная зима, во время которой летучие мыши неактивны.

2. Тяжесть протекания болезни и высокая смертность для человека создают впечатление, что Природа специально «выводила» максимально опасный для людей вирус. Так ли это? Объясните, откуда в природе берутся новые высокосмертельные для человека вирусы? Как вы думаете, повышается или понижается смертность ВЭ в ходе текущей эпидемии? Будущие вспышки ВЭ будут более или менее смертельными для человека? (2 балла)

Природа **не создает** вирусы, «специально» опасные для людей. Новые опасные вирусы попадают к человеку, как правило, от животных. Вирусы длительно эволюционируют в своем естественном резервуаре вместе со своими хозяевами, ведя борьбу с их иммунной системой. При этом естественный отбор идет так, что вирус тренируется «обходить» иммунную систему хозяина, а хозяин - бороться с новыми «уловками» вируса. Такая система обычно находится в равновесии (не побеждает ни вирус, ни хозяин): для тех же летучих мышей ВЭ не только не является смертельным, но и протекает бессимптомно. При случайном попадании вируса к человеку может оказаться, что вирус научился слишком хорошо «обходить» иммунную систему старого хозяина, поэтому иммунная система человека, впервые столкнувшись с новым вирусом, слишком легко побеждается.

В ходе эпидемии смертность вируса **снижается**: вирус эволюционно более «заинтересован» в своем распространении (увеличение числа носителей), а не в быстрой гибели хозяина или в его тяжелой болезни. Таким образом, в ходе естественного отбора на протяжении эпидемии будут шире распространяться те вирусы, мутации которых способствуют «пощаде» хозяина. Но важно отметить, что после окончания эпидемии среди людей «получающийся» менее смертельный для человека штамм ВЭ, скорее всего, из природы исчезнет (см. п.1). Новые вспышки ВЭ вызываются «дикими» штаммами, поэтому они могут случайным образом оказаться как более, так и или менее смертельными для человека. Однако если в местах распространения ВЭ им переболеет существенная доля населения, то смертность последующих вспышек может существенно понизиться из-за появившегося иммунитета и прошедшего отбора на устойчивость к ВЭ.

3. Анализ геномов Эболавирусов показывает, что человечество живет с ними рядом в течение как минимум тысячелетий, однако об этих вирусах стало известно лишь в 70-х годах прошлого века.

Угрожали ли раньше Эболавирусы человечеству отдельными вспышками или эпидемиями? Участились ли за последние полвека вспышки Эболавирусов? Действительно ли повысилась связанная с ними опасность? Связано ли это с эволюцией вирусов? Поясните. (2,5 балла)

Очевидно, что вспышки Эболавирусов случались и до обнаружения этих вирусов. Однако труднодоступность мест резервуара, незаразность вируса до появления симптомов, быстрое и тяжелое течение болезни, малая плотность населения – все это не давало большинству таких вспышек широко распространиться и перерасти в эпидемию, они быстро локально угасали. Несмотря на это, Эболавирусам, возможно, уже удавалось вызвать эпидемию в Европе и раньше. Как пример – пришедшая в 429 году до н. э. из Африки Афинская чума, сопровождавшаяся схожими с геморрагической лихорадкой симптомами (отмечалась икота – редка при других болезнях, но распространенный симптом при эпидемии ВЭ).

Сейчас, благодаря глобализации, во-первых, появились большие города, человеческие контакты стали более интенсивными, во-вторых, благодаря авиации «сократились» расстояния: за меньший срок вирус теперь может преодолеть гораздо большие расстояния. В-третьих, повысилась плотность населения и за пределами городов, человек стал чаще соприкасаться с дикими животными. Джунгли вырубали, на их месте появились сады, куда переселились дикие животные, в том числе являющиеся носителями ВЭ летучие мыши, что повысило вероятность контакта человека с больными животными.

Поэтому частота вспышек ВЭ повышается, равно как увеличилась связанная с ними опасность (вирус стал чаще попадать к людям и получил возможность быстрее среди них распространяться, в то время как уровень медицины в подверженных опасности регионах адекватно не улучшился).

4. Диагностика. Для борьбы с эпидемией важно уметь быстро выявлять и изолировать заболевших. На начальном этапе симптомы (лихорадка, головная боль) могут напоминать симптомы распространенных, но значительно менее опасных заболеваний.

Вкратце перечислите, каковы основные «наноследы» присутствия ВЭ в организме? Как они выявляются? (1 балл)

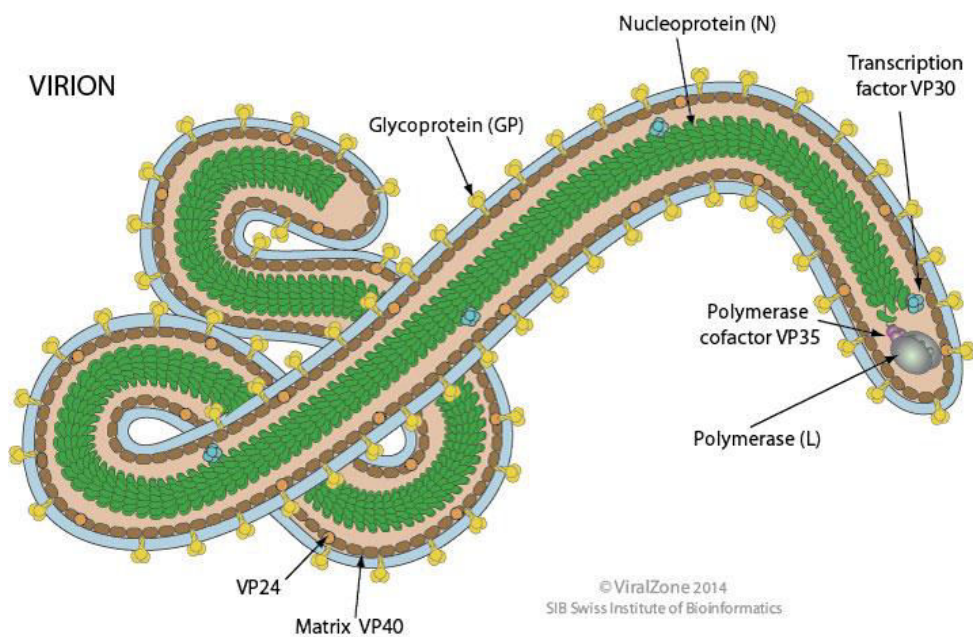
При заражении ВЭ, в организме появляются обычные для вирусов «наноследы»: генетический материал вируса (РНК), белки вируса, вирионы, антитела, вырабатываемые человеком в ответ на вирус. Поскольку эти «наноследы» являются специфическими для

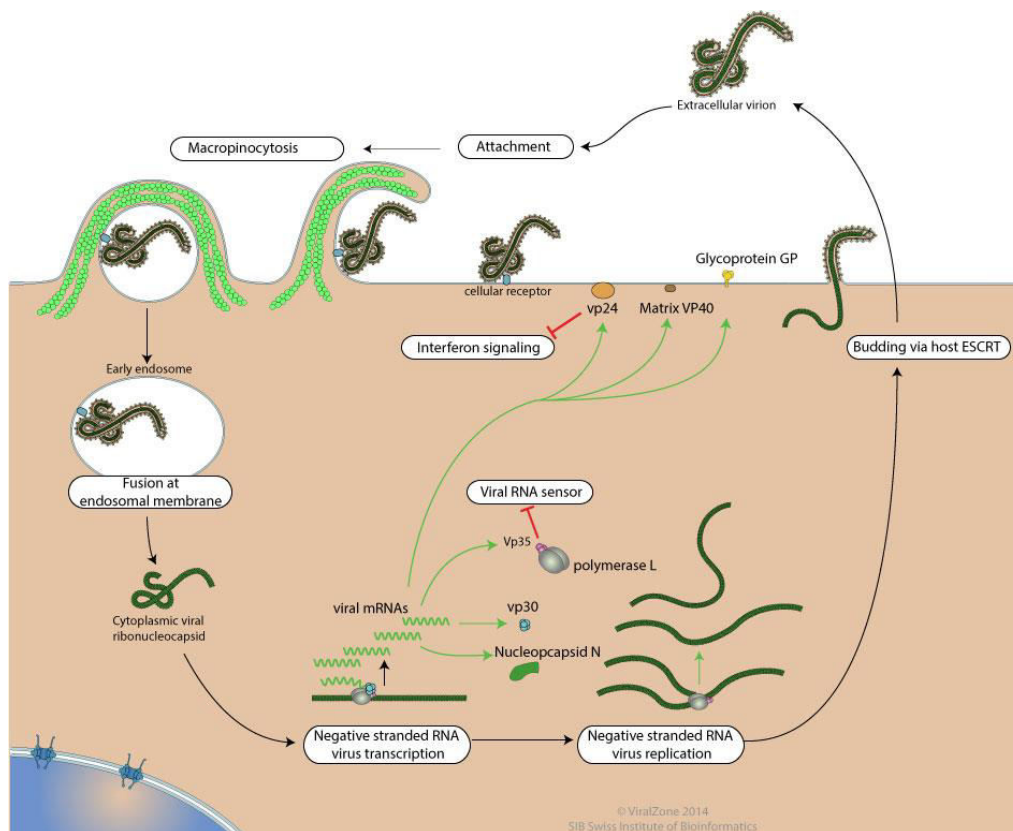
каждого конкретного вируса, то их обнаружение используется для точной диагностики. Так, для подтверждения того, что симптомы вызваны именно вирусом Эбола, согласно ВОЗ могут проводиться следующие анализы:

- энзим-связывающий иммуносорбентный анализ с захватом антител (ELISA, ИФА) выявление анти-Ebola-IgM;
- тесты на выявление антигенов;
- реакция сывороточной нейтрализации (методы постановки серологических реакций (РНГА, РСК, РН));
- полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР, поиск РНК вируса);
- электронная микроскопия – визуальный поиск вирионов в клетках (слюна, кровь, другие биологические жидкости);
- изоляция вируса в клеточных культурах.

5. Против наномашин. Чтобы понять какие уязвимые места есть в «наномашине» вируса, надо узнать, как она устроена и как работает.

Вкратце опишите, как устроен вирус Эбола и каковы основные стадии его жизненного цикла при попадании вовнутрь организма. Какие основные мишени (и на какой стадии жизненного цикла) для атаки вируса можно выделить? Поясните, на какой стадии жизненного цикла они уязвимы. (2 балла)





Как и другим вирусам, ВЭ необходимо проникнуть в клетку, где с использованием рибосом и строительного материала в клетке, а также своих ферментов, произвести необходимые «нанозапчасти» для сборки новых вирионов (белки, ферменты, новый генетический материал).

Жизненный цикл вируса начинается с закрепления на поверхностных рецепторах клетки, что вызывает его проникновение внутрь путем макропиноцитоза с последующим освобождением материалов вируса от капсида внутри клетки. РНК-зависимая РНК-полимераза читает (-)РНК вируса и транскрибирует гены в матричные РНК, которые затем транслируются с помощью рибосом клетки в необходимые вирусу белки. Когда белков капсида вируса становится много, полимеразы начинают репликацию генома. Для этого на основе (-)РНК полимеразы делает (+)РНК, по которой и производятся копии (-)РНК генома для новых вирионов. Вирионы начинают самосборку возле мембраны, и отпочковываются от клетки вместе с частями ее мембраны.

Наиболее очевидные основные мишени:

а) **До проникновения вируса в клетку.** Связывание вируса с клеткой определяется поверхностным **гликопротеином**. Поэтому до того, как вирус успеет связаться с рецепторами клетки, эти белки являются хорошей мишенью. Если, например, с ними свяжутся антитела или синтетические «фальшивые» рецепторы, то вирус не сможет проникнуть в клетку.

б) После проникновения вируса в клетку становятся уязвимыми его внутренние жизненно важные «нанозапчасти» – генетический материал и ферменты. Основные мишени – РНК и полимеразы (см. п. 9 и 10).

6. Несмотря на огромные потенциальные возможности нанотехнологий, на текущий момент при экспериментальном лечении больных ВЭ людей в качестве действующих веществ широко используются лишь несколько типов нанообъектов: РНК и белки.

Приведите примеры таких лекарств. Поясните, как они работают, если их принципы действия были «подсмотренные» у природы. Какие нанообъекты могут быть использованы для доставки к цели этих лекарств? (3 балла)

Белки интерфероны (см. Википедия: [Интерферон](#)).

Использование готовых антител (чаще всего к гликопротеину ВЭ, см. п. 5):

– **ZMapp™** (США) - представляет собой смесь трех гуманизированных (т.е. рекомбинантных, содержащих элементы иммуноглобулина человека для уменьшения иммунного ответа при введении человеку антител, изначально полученных у животных) моноклональных антител, полученных по гибридомной технологии (антитела с13С6 , с2G4 и с4G7 к гликопротеину ВЭ).

– Антитела как переболевших ВЭ людей (см. ниже про донорскую кровь), так и антитела животных (выделяют из сыворотки крови иммунизированных животных).

Заставить организм вырабатывать антитела:

– Вакцина **VSV-EBOV**, Канада: рекомбинантная вакцина на основе вируса везикулярного стоматита (встроен ген гликопротеина Эболы, чтобы спровоцировать иммунный ответ на него).

– Вакцина **cAd3-ZEBOV** (the NIAID/GSK Ebola vaccine): рекомбинантная вакцина на основе аденовируса шимпанзе (встроены гены гликопротеина Эбола-Заир и Эбола-Судан).

РНК-интерференция (см. Википедия: [Малые интерферирующие РНК и РНК-интерференция](#)):

– **ТКМ-Ebola** – препарат способен «выключать» синтез трех из семи белков Эболавируса – полимеразы, мембранно-ассоциированный белок VP24 и кофактора полимеразы VP35. Доставка – патентованные липидные наночастицы везикулы.

Антисмысловая терапия (см. Википедия: [Антисмысловая терапия](#)) с использованием коротких комплементарных одноцепочечных РНК (а также и их аналогов, прочнее связывающихся с мишенью, например на основе <https://ru.wikipedia.org/wiki/Морфолино>).

РНК в свободном виде плохо подходят для доставки в зараженные клетки через кровотоки, поэтому, для их доставки широко используются наночастицы (дендримеры, везикулы,

липиды, капсиды вирусов), поверхность которых часто дополнительно маскируют от иммунной системы, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ).

7. Как вы оцениваете эффективность предложенного в Нигерии нового экспериментального метода борьбы с ВЭ при помощи препарата Nano Silver? (1 балл)

Наночастицы серебра (действительно обладающие антибактериальными свойствами), как правило, не обладают большой селективностью при взаимодействии с возможным материалом вируса, т.е. «не различают» похожие биоматериалы живой клетки и вируса (белки, РНК). Поэтому, несмотря на то, что наночастицы серебра, вполне могли бы реагировать с белками вируса (например, с остатками цистеина из-за большого сродства серебра к сере), они точно так же могут реагировать и с белками организма. Если бы препараты наносеребра действительно могли бы эффективно подавлять вирусы в живом организме, то мы бы уже об этом давно знали на примере других менее экзотических и более изученных вирусов. Поэтому, для эффективного лечения ВЭ необходимы те препараты, действие которых действительно может быть избирательно направлено на вирусные мишени – именно над их созданием и испытанием сейчас работает мировая наука и нанотехнологии.

8. В странах Африки, где бушует эпидемия, на черном рынке пользуется спросом кровь переболевших ВЭ людей. Может ли такая кровь использоваться для лечения ВЭ? Вкратце опишите, чем может быть опасно переливание такой крови. (1 балл)

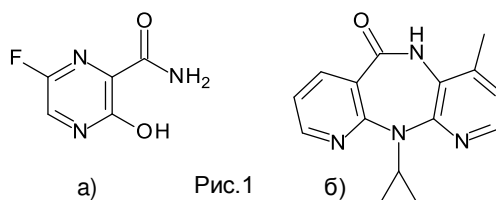
Такая кровь может быть использована, поскольку она содержит антитела к ВЭ.

Опасности, которые могут возникнуть при переливании «контрабандной» крови:

- несовместимость по группам крови и резус-фактору;
- недостаточная стерилизацией аппаратуры для переливания;
- наличие у донора других вирусов помимо Эболы (ВИЧ, гепатит и т.д.);
- индивидуальная несовместимость донора и реципиента.

Конечно, переливать кровь целиком необязательно: можно выделить плазму, или еще лучше, только фракцию иммуноглобулинов. Стоит отметить, что такой метод лечения действительно уже применялся (правда, в комплексе с другими экспериментальными методами) при лечении ВЭ.

9. Заманчиво, если бы для лечения ВЭ подошли какие-нибудь из многочисленных противовирусных препаратов, которые уже широко используются в медицинской практике.



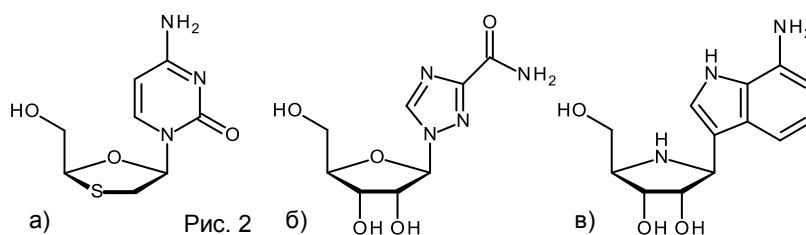
Какое из двух лекарств – фавипиравир (рис. 1а, действует против вируса гриппа) или невирапин (рис. 1б, против ВИЧ) – вы бы в первую очередь проверили на активность против вируса Эбола? Почему? (1 балл)

Для ответа на вопрос необходимо сравнить все эти вирусы.

Вирусы Эбола и гриппа относятся к одному классу классификации вирусов по Балтимору (вирусы, содержащие одноцепочечную (-)РНК) т.е. имеют одинаковый тип нуклеиновой кислоты и одинаковый способ ее репликации в клетке хозяина (и, соответственно, относительно близкие полимеразы). В то время как вирус ВИЧ относится к другому классу вирусов – содержащих одноцепочечную (+)РНК, реплицирующихся через стадию ДНК; его клеточный цикл значительно отличается.

Поэтому, если ничего не знать о принципе действия этих лекарств, в первую очередь необходимо проверить **фавипиравир**. И действительно, фавипиравир подавляет РНК-зависимую РНК-полимеразу обоих вирусов. В то время как невирапин подавляет отсутствующую у ВЭ обратную транскриптазу (необходима для синтеза ДНК цепочки на основе РНК вируса).

10. На рисунке 2 изображено несколько химических соединений, проявляющих активность против ВЭ в живой клетке:



Основываясь на структурах этих лекарств, предположите, что они могут «поломать» в жизненном цикле вируса. (2 балла)

Все приведенные структуры довольно похожи на нуклеозиды. После фосфорилирования в клетке они станут похожи на нуклеотиды, и логично предположить, что, раз они подавляют вирус, то, скорее всего наиболее вероятной мишенью для них является полимеразу вируса, которая, «обманываясь», пытается включить эти молекулы (после фосфорилирования в клетке) в состав растущей цепи РНК. Однако все три молекулы содержат структурные отличия от нуклеозидов, которые не дадут им вести себя в точности как нуклеозиды, что может вызывать

при процессах транскрипции и репликации различные ошибки и поломки в РНК, которая строится полимеразой (п. 5).

(а) не содержит 3'-ОН группы, к которой можно было бы присоединить следующий нуклеотид. Разрабатывался как прерыватель цепочки ДНК вирусов (аналог дезоксицитидина). Вероятно, также может обмануть РНК полимеразу ВЭ как аналог цитидина.

(б) может подхватываться РНК-полимеразой вируса и встраиваться в растущую цепь РНК. Поскольку молекула не соответствует конкретному нуклеозиду (отдаленно напоминает и аденозин, и гуанозин), то при встраивании таких молекул в РНК, и последующем считывании будут происходить ошибки. Если таких ошибок будет достаточно много, генетический материал и белки собираемых вирионов окажутся необратимо поврежденными.

(в) останавливает построение РНК цепочки через пару нуклеотидов, вероятно, вследствие «закручивания» нити РНК от нестандартной формы и химических свойств такого аналога аденозина.