

Wirus – niewidzialny przeciwnik

Elżbieta Szczepańska

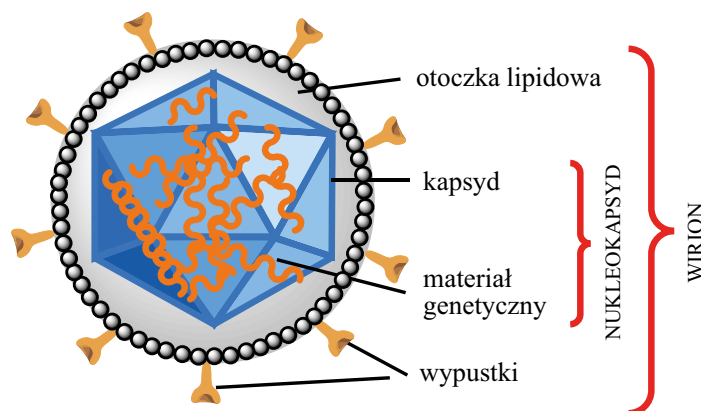
W związku z pandemią COVID-19, ze względu na rosnącą potrzebę zdobycia wiedzy na ten temat powstaje coraz więcej publikacji dotyczących koronawirusa, z którym obecnie przyszło zmierzyć się biologom, biotechnologom, lekarzom, farmaceutom, chemikom i innym naukowcom. Jednak czym są ogólnie wirusy? Jak są zbudowane? Jakie są metody ich wykrywania?

Historia poznania wirusów zaczęła się w 1892 r., kiedy to Dmitri Iwanowski wykazał, że czynnik zakaźny choroby mozaikowej tytoniu, przejawiający się jako przebarwienie liści, przeszedł przez filtr nieprzepuszczalny dla bakterii. Iwanowski nie docenił jednak własnego odkrycia, dopiero Martinus Willem Beijerinck, który powtórzył te eksperymenty w 1898 roku, nabrał przekonania o tym, iż poznał nową formę czynnika zakaźnego. Nazwał ją żywym, zakaźnym płynem (*łac. contagium vivum fluidum*), znanym obecnie pod pojęciem wirusa.

Struktura wirusów

Od tego czasu wiedza na temat wirusów oczywiście znacznie się pogłębiła. Wiemy przede wszystkim, że wirusy to niewielkich rozmiarów czynniki zakaźne (o średnicy od około 20 do 500 nm), które do rozmnażania potrzebują gospodarza, takiego jak zwierzęta, rośliny lub bakterie. Kształty wirusów są przeważnie dwojakiego rodzaju. Mogą występować w formie pręcików lub filamentów (z powodu liniowej matrycy kwasu nukleinowego i podjednostek białkowych) oraz kuli, które są w rzeczywistości dwudziestościenne wielokątami.

Nie zalicza się ich do organizmów żywych ze względu na brak struktury komórkowej, w tym organelli. Ogólna budowa wirusa przedstawiona została na Rysunku 1. Najprostsze z nich złożone są z materiału genetycznego (stanowi go kwas deoksyrybonukleinowy – DNA lub kwas rybonukleinowy – RNA) oraz białek tworzących płaszcz (tzw. kapsyd). Taka dwuskładnikowa struktura nowi nazwę nukleokapsydu [1]. W niektórych wirusach nukleokapsyd jest pokryty zewnętrzną błoną. Błona ta składa się z dwuwarstwy fosfolipidowej (otoczka lipidowa) oraz z jednego lub dwóch typów białek połączonych kowalencyjnie z oligosacharydami tzw. glikoprotein (wypustki). Fosfolipidy w otoczce wirusa są podobne do tych w błonie komórkowej zakażonej komórki gospodarza, ponieważ wirusowa otoczka jest w rzeczywistości uzyskiwana przez uwalnianie (pączkowanie) z zainfekowanej komórki. Mimo to otoczka ta zawiera głównie wirusowe glikoproteiny. Kompletna cząstka wirusa nazwana została wirionem [2].



Rysunek 1. Budowa wirusa. Rysunek wykonany przez autora (na podstawie [1]).

Zazwyczaj każdy wirus ma zawężone grono gospodarzy, których może atakować, stąd wynika podstawowy ich podział. Wirusy atakujące bakterie nazywa się bakteriofagami lub fagami, a wirusy mające za gospodarza rośliny i zwierzęta są nazywane, odpowiednio, wirusami roślinnymi i zwierzęcymi. Jednak istnieją wirusy, które mogą rozwijać się zarówno w roślinach, jak i owadach, które się nimi żywią. Dla przykładu wysoce mobilne owady służą jako wektory do przenoszenia wirusów między podatnymi gospodarzami roślin. Przykładem jest wirus żółtej karłowatości ziemniaka, który może rosnąć u koników polnych (owadów, które żywią się liśćmi roślin ziemniaka), a także u roślin ziemniaka.

Bardziej złożone kryteria podziału wirusów obejmują takie cechy, jak: rodzaj i liczba nici materiału genetycznego, występowanie osłonki lipidowej oraz polarność genu (kompletny materiał genetyczny) wirusa.

Etapy rozmnażania wirusa

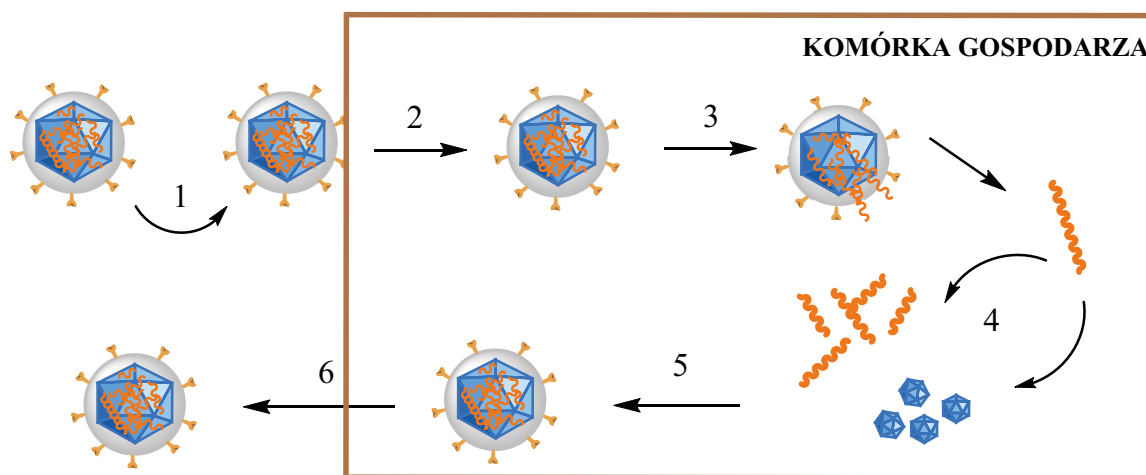
Szczegółowe fazy powielania wirusów są specyficzne dla konkretnego przypadku, jednak ogólnie można wskazać sześć etapów (Rysunek 2). W fazie początkowej wirus przyczepia się do powłoki gospodarza. Jest to możliwe dzięki wiązaniu się białek obecnych na powierzchni wirusa z receptorami na powierzchni komórki gospodarza. Ważną rolę w wiązaniach wirus-receptor pełnią oddziaływania wodorowe, jonowe oraz van der Waalsa, po czym wirus penetruje do komórki gospodarza. Wnikanie wirusa do komórki jest zwykle reakcją, która nie wymaga nakładu energii ze strony wirusa. Następnie dochodzi do uwolnienia materiału genetycznego cząstki zakaźnej, co zostanie użyte w fazie biosyntezy. Dochodzi w niej do powielania genu w procesach przepisywania informacji z DNA na mRNA (transkrypcji) oraz syntezy białka na wcześniej wspomnianym mRNA (translacja). W etapie końcowym dochodzi to kompletowania gotowej cząstki wirusowej i uwolnienia jej poza komórkę gospodarza.

Diagnostyka

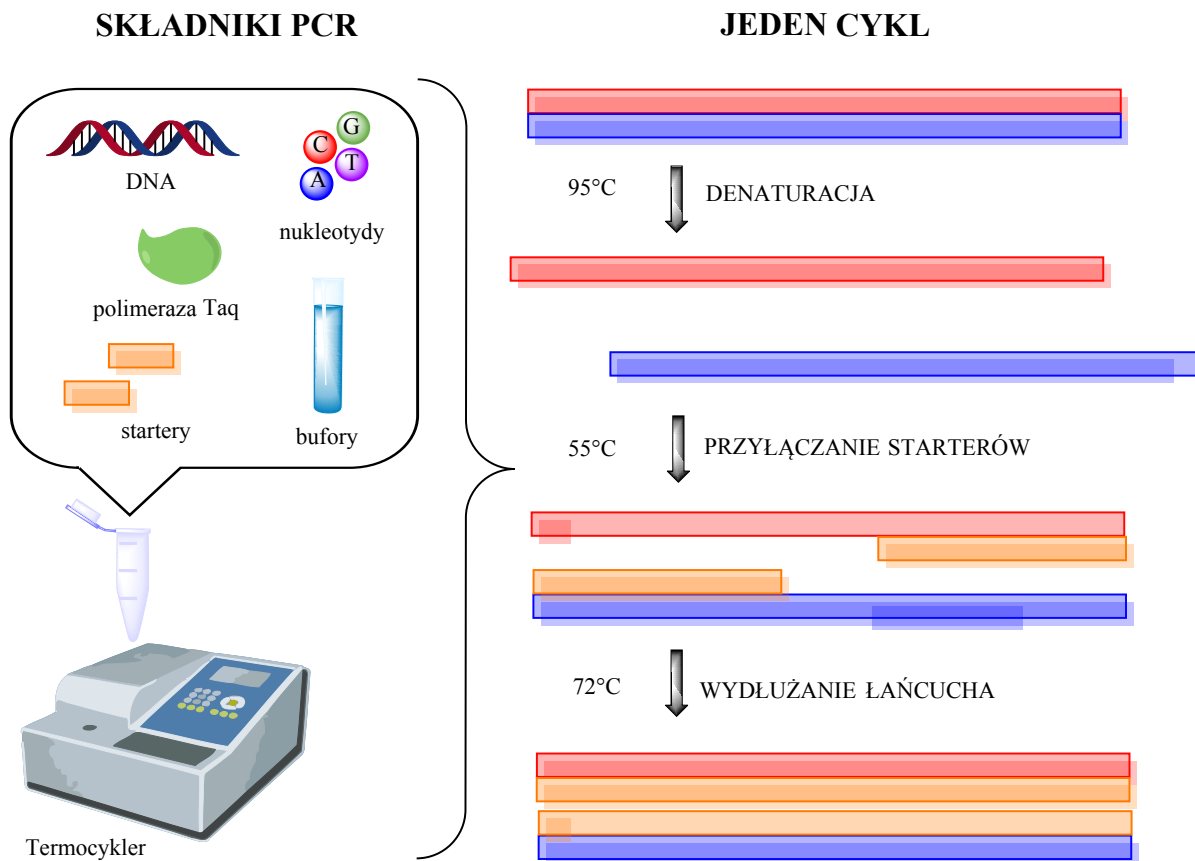
Ze względu na przedstawioną wcześniej strukturę wirusów, metody ich wykrywania dotyczą przede wszystkim otoczki białkowo-lipidowej oraz materiału genetycznego. Bezpośrednio wirusy można zobaczyć pod mikroskopem elektronowym (dedykowanym obserwacji struktur w skali nanometrycznej). Jednym z ograniczeń tej metody do celów diagnostycznych jest potrzeba dużej ilości próbki (powyżej 10^{11} cząsteczek na 1 ml próbki), dlatego badania obecności wirusów przeprowadza się głównie pośrednio, co wykonuje się na trzy sposoby.

Pierwszym jest rozmnażanie wirusów w specjalnie przygotowanych hodowlach komórkowych. Ze względu na to, że wirusy poza organizmem gospodarza nie mogą się rozmnażać, stwarza się im sztuczne warunki rozwoju, dodając specjalnie przygotowane pożywki. Metody te służą przede wszystkim do poznania mechanizmów rozwoju wirusa, produkcji szczepionek oraz leków.

Kolejnym sposobem jest wykrywanie kwasu nukleinowego wirusa, np. przy użyciu metody łańcuchowej reakcji polimerazy (*ang. polymerase chain reaction, PCR*). Jest to metoda szczególnie przydatna, gdy mamy do czynienia z niewielką ilością wirusa, ponieważ polega ona na zwielokrotnianiu jego materiału genetycznego. Na tej zasadzie działają testy diagnostyczne, które wykonywane są w momencie rozwoju (inkubacji) w ciele gospodarza, dlatego próbki do tego typu badań pobierane są z miejsc objętych zakażeniem np. z dróg oddechowych. W przypadku gdy wirus zawiera informację genetyczną zapisaną w RNA, do tej metody należy dodać etap przepisywania informacji z RNA na DNA. Metoda PCR opiera się na trzech etapach przedstawionych na Rysunku 3, które przeprowadzane są w termocyklerze (urządzeniu zapewniającym odpowiednią temperaturę poszczególnych faz reakcji). Do reakcji potrzebne są składniki takie jak: DNA, mieszanka nukleotydów, termostabilna polimeraza (np. polimeraza Taq, enzym



Rysunek 2. Ogólne fazy rozmnażania wirusów. Etapy: 1 – przyłączenie wirusa do komórki gospodarza, 2 – penetracja wirusa do wnętrza komórki, 3 – uwolnienie materiału genetycznego, 4 – powielanie materiału genetycznego w procesach transkrypcji i translacji, 5 – powstanie kompletnych cząstek wirusa, 6 – uwolnienie wirusa poza komórkę gospodarza. Rysunek wykonany przez autora (na podstawie [3]).

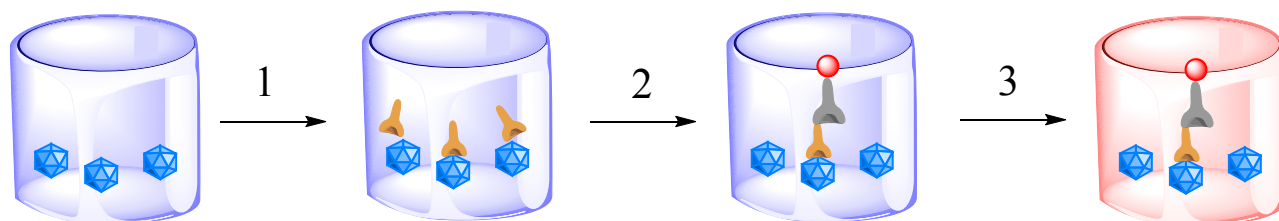


Rysunek 3. Składniki oraz etapy metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wraz z podanymi przybliżonymi temperaturami reakcji. Rysunek wykonany przez autora (na podstawie [4]).

przyspieszający reakcję syntezy informacji genetycznej), startery (krótkie fragmenty DNA, identyczne z końcami DNA wirusa) oraz bufory (zapewniające odpowiednie pH środowiska). Po trzecim etapie następuje powtórzenie reakcji (w drugim cyklu mamy już dwie nici DNA, które podlegają denaturacji). Reakcja zachodzi do wyczerpania substratów [3].

Ostatnim sposobem jest badanie oddziaływania wirusa z przeciwciałem (inaczej antyciałem – białkiem zdolnym do rozpoznawania antygenów, co stanowi obronę układu odpornościowego przed czynnikami zakaźnymi), skierowanym przeciwko niemu (na tym polegają tzw. testy serologiczne), Zalicza się do nich np. technikę ELISA (*ang. en-*

zyme-linked immunosorbent assay) (Rysunek 4). Co ważne, metoda ELISA to technika, która w przeciwieństwie do PCR wykonywana jest po okresie rozmnażania wirusa, kiedy organizm gospodarza wytworzył już odpowiednią ilość przeciwciał w krwi. Ze względu na powszechne wykorzystanie tej metody w laboratoriach istnieje kilka jej wariantów (najczęściej wykorzystywany jest typ pośredni). Technikę ELISA prowadzi się najczęściej w 96-dołkowych płytkach. W pierwszym etapie badania typu pośredniego przeprowadza się wprowadzając antygeny wirusowe (antygenem określamy substancję, która wywołuje odpowiedź organizmu, w wyniku której powstają przeciwciała) i inkubuje przez określony czas. Następnie wprowadza się



Rysunek 4. Schemat pośredniego testu ELISA. Etapy: 1 – do antygenów wirusowych przyłączają się specyficzne przeciwciała, 2 – przyłączenie kolejnego przeciwciała z enzymem, 3 – enzym wyzwała możliwą do obserwacji reakcję barwną. Rysunek wykonany przez autora (na podstawie [3]).

roztwór przeciwciała skierowany na konkretny antygen. Po przyłączeniu wprowadza się kolejne przeciwciało z przyłączonym enzymem. Enzym w ostatnim etapie daje reakcję barwną, co pozwala jakościowo i ilościowo określić obecność wirusa.

Metody zwalczania wirusów

Obecnie znanych jest wiele strategii zwalczania wirusów. Najprostszy sposób zwalczania infekcji wirusowej wykorzystuje środki chemioterapeutyczne, takie jak detergenty, chloroform i światło ultrafioletowe, co związane jest z ogólnymi mechanizmami rozwoju wirusów w środowisku. Jest to szczególnie skuteczne w zmniejszaniu poziomu organizmów otoczkowych.

Kolejne środki przeciwwirusowe obejmują cząsteczki skierowane na receptory przyłączania się do komórek gospodarza, hamujące penetrację wirusa, niepowlekanie genomu wirusowego lub replikację wirusa. Hamowanie replikacji może wystąpić na wielu etapach. Środki mogą być skierowane przeciwko rozmnażaniu się wirusów lub mogą hamować procesy transkrypcji i translacji. Większość klinicznie dostępnych leków przeciwwirusowych jest ukierunkowanych na syntezę kwasów nukleinowych i ograniczanie replikacji wirusa. Największym problemem w stosowaniu środków przeciwwirusowych jest powstawanie mutacji wirusów, co wiąże się z długotrwałym leczeniem, ponieważ wirusy przestają być podatne na działanie leku.

Inna klasa substancji przeciwwirusowych obejmuje te, które działają jako immunomodulatory (substancje wpływające na układ odpornościowy) w celu poprawy odpowiedzi gospodarza na zwalczanie infekcji. Te środki przeciwwirusowe nie atakują bezpośrednio określonego patogenu, ale stymulują odpowiedzi immunologiczne gospodarza. Naturalnymi immunomodulatorami są rośliny lecznicze, takie jak: jeżówka, czosnek, żeń-szeń, a także wyciąg z grasicy, propolis (kit pszczeli). Są one stosowane jako domowe sposoby radzenia sobie z infekcjami, a na ich bazie powstaje wiele środków leczniczych dostępnych w aptekach.

Najbardziej wyspecjalizowanym podejściem jest synteza przeciwciał wiążących się z patogenami wirusowymi w celu oznaczenia ich pod kątem ataku i usuwania przez inne elementy układu odpornościowego. Szczepienia, bo o nich mowa, wywołują stan pierwotny, tak że ponowne (wtórne) narażenie na patogen generuje szybką odpowiedź immunologiczną, co prowadzi do przyspieszonej eliminacji z organizmu i ochrony przed wystąpieniem choroby. Szczepionki przeciwwirusowe są skuteczne, gdy są podawane gospodarzowi w sposób podobny do naturalnej ekspozycji na antygeny wirusowe, generując w ten sposób odporność ochronną [5].

Przykłady chorób wirusowych

- Świnka – przekazywana drogą kropelkową choroba głównie wieku dziecięcego, objawiająca się powiększeniem ślinianek przyusznych, przez co twarz staje się na-



brzmiała. Wywołana jest przez wirusa świnki zaliczanego do paramykowirusów z otoczką oraz materiałem genetycznym, który stanowi RNA.

- Ospa wietrzna – przenoszona przez bezpośredni kontakt z drugą osobą, najczęściej drogą kropelkową. Objawia się przede wszystkim krostkami na ciele, gorączką i innymi nieprzyjemnymi dolegliwościami. W większości przypadków ma przebieg łagodny, jednak niewielki odsetek zachorowań powoduje groźne powikłania. Choroba spowodowana jest atakiem wirusa ospy wietrznej i półpaśca zaliczanego do herpesvirusów.
- Grypa – wywołana wirusem grypy, należącego do trzech grup (A, B i C) ortomyksowirusów, przekazywanych drogą kropelkową. Ze względu na jego dużą zmienność genetyczną powstaje coraz to więcej jego odmian, co prowadzi do częstych epidemii. Objawi najczęściej obejmują gorączkę, dreszcze, bóle mięśni oraz głowy.
- Różyczka – przyczyną tej choroby jest wirus otoczkowy z rodziny togawirusów. Powoduje drobną, czerwoną wysypkę, ale także powiększenie węzłów chłonnych [6].

Mgr Elżbieta Szczepańska
Doktorantka, Uniwersytet Gdański

Bibliografia:

- [1] Wirusy, Wikipedia Wolna Encykl. (2020). <https://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Wirusy&oldid=59530014> (accessed May 4, 2020).
- [2] H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, Viruses: Structure, Function, and Uses, Mol. Cell Biol. 4th Ed. (2000). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/> (accessed April 28, 2020).
- [3] Introduction to Modern Virology, 6 edition, Wiley-Blackwell, Malden, MA, 2007.
- [4] Na czym polega badanie DNA metodą PCR? - jak pracuje laboratorium molekularne, Borlamed – Med. Lab. Diagn. (2019). <https://borlamed.pl/na-czym-polega-badanie-dna-metoda-pcr-jak-pracuje-laboratorium-molekularne/> (accessed May 14, 2020).
- [5] J.K. Actor, 13 – Basic Virology, in: J.K. Actor (Ed.), Elseviers Integr. Rev. Immunol. Microbiol. Second Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 2012: pp. 121–128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07447-6.00013-2>.
- [6] Choroby wirusowe, Wikipedia Wolna Encykl. (2020). https://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Choroby_wirusowe&oldid=59337752 (accessed May 7, 2020).