

А.М. Бондаренко

ПЕРСПЕКТИВИ РОЗРОБКИ СПОСОБІВ І ЗАСОБІВ АНТИВІРУСНОЇ ТЕРАПІЇ

Центр діагностики й терапії інфекційних хвороб, ОКУ «Криворізька інфекційна лікарня № 1»

Проведений аналіз застосування основних сучасних засобів і методів протівірусної терапії, сучасних біотехнологій, досягнень молекулярної біології та генетики. На базі цих даних автором запропоновані практичні способи та засоби антивірусної терапії і перспективи їх розробки в майбутньому. Особлива увага приділена векторним технологіям. Обґрунтовано необхідність активного пошуку нових засобів і методів протівірусної терапії.

Ключові слова: протівірусна терапія, біотехнології.

Ще 10 років тому на одній з міжнародних конференцій, присвяченій проблемам антимікробної терапії, за підсумками роботи був зроблений невтішний висновок – якщо протягом найближчих 20-25 років не вдасться створити принципово нові та кардинально відмінні від вже існуючих за механізмом дії та активністю антимікробні препарати, то вже до цього часу мікроорганізми будуть здатні до створення і реалізації механізмів резистентності навіть до ще не створених антимікробних препаратів! Таким чином, за цей час патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми зможуть створити природні генетичні біологічні механізми захисту фактично від усіх існуючих сьогодні або навіть створених у майбутньому видів антимікробних препаратів, але за вже «відомими» мікроорганізмам принципами дії й структурою цих засобів. Така швидка реалізація полірезистентності буде здійснена за рахунок передачі генетичної інформації не тільки мікробним «нащадкам», але й за рахунок механізмів всередині і міжвидового генного та вірусного векторного обміну. Дійсно, незважаючи на прогрес біотехнологій, за останні 20 років так і не були створені принципово нові засоби антимікробної хіміотерапії, в тому числі протипаразитарні й протівірусні. Важливо, що, незважаючи на простоту будови вірусів, навіть порівняно з бактеріями, темпи росту резистентності збудників вірусних інфекцій до антимікробних

препаратів істотно випереджають такі у бактерій, грибів і найпростіших. Тому вже сьогодні необхідна розробка кардинально нових антимікробних препаратів, що мають принципово нові механізми реалізації дії та активності. Також нагально необхідні і принципово нові підходи до проведення антимікробної терапії. Головною метою такої терапії має стати створення нової генерації антимікробних препаратів з універсальними молекулярними механізмами дії, до яких у мікроорганізмів не буде можливості для формування механізмів резистентності.

На жаль, сьогодні ми все ще «йдемо вслід» за мікробною резистентністю, створюючи лавину модифікованих аналогів «старих» препаратів, з труднощами переборюючи у мікроорганізмів уже природні, наслідовані й передані ними механізми генетичної резистентності. Мало того, у біологічному мікросвіті вже давно стали нерідкими випадки формування ауксотрофних мутантів, стійких не тільки до антибактерійних препаратів, але навіть метаболічно від них залежних. Але, якщо існуючим арсеналом антибактерійних препаратів ще вдається в більшості випадків боротися зі збудниками бактерійних інфекцій, то відносно антивірусної терапії – має місце зовсім зворотна ситуація. І це незважаючи на те, що ми вже досить давно маємо доволі глибокі й повні знання про структуру та геноми вірусів, молекулярні механізми їх взаємодії з біооб'єктами, механізми, способи і засоби їх розмноження та передачі.

Правда, сьогодні вже існують антивірусні препарати, які можуть бути розділені на групи за подібними механізмами дії, які спрямовані на різні етапи репродукції вірусів у клітинах. Це аномальні нуклеотиди та нуклеозиди, інгібітори вірусних протеаз, інгібітори зворотної транскриптази, інгібітори проникнення і злиття та ін. Але число таких груп і число препаратів у цих групах – вкрай незначне. А з врахуванням досить вузького спектру активності антивірусних засобів, нерідко ефектив-

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

них тільки до окремих типів у межах навіть однієї вірусної підродини, спектр антивірусних препаратів порівняно з величезним числом вірусів є фактично мізерним.

Всі існуючі на сьогодні антивірусні препарати мають найчастіше виняткову вибірковість і ефективні тільки стосовно окремих вірусних збудників, а нерідко навіть тільки їх окремих генотипів. Препаратів для системного застосування з широким спектром антивірусної активності сьогодні фактично немає. Це пояснюється тим, що створення ефективних антивірусних препаратів все ще залишається результатом колосального емпіричного відбору з величезного числа «претендентів» з антивірусною активністю. Але й такі вдачі ще досить рідкі.

Необхідно відзначити, що універсальних, реально ефективних, практичних засобів впливу на вірусний геном сьогодні ще фактично немає. Виняток становлять тільки аномальні нуклеотиди, але до цих препаратів досить швидко формується генетично обумовлена резистентність, вже властиво й пов'язана з вірусним геномом, який мутує [1-3]. Тому саме вірусний геном, по суті, є фактично єдиною реальною мішенню для ефективного впливу противірусних препаратів. Саме геном, або точніше визначити його як «специфічну генетичну програму», є основою і найголовнішою частиною вірусу, що зумовлює всі його властивості. У процесі репродукції вірусу його геном досить вразливий і його пошкодження є найбільш оптимальним варіантом універсального механізму дії для антивірусних засобів. Саме ушкодження або знищення первинної програми і є теоретично найефективнішим засобом антивірусної терапії. Але чи так це?

Фактично віруси у своєму різноманітті та самодостатності є величезним числом розрізнених «комп'ютерних програм» або «програмне забезпечення» для біологічних комп'ютерів. По суті, не будучи повноцінними «живими об'єктами», віруси несуть реальну програмну інформацію в чутливі до них живі клітини, які також необхідно розглядати як надскладні саморегулюючі кібернетичні системи з відкритими порталами для вводу програмної інформації, що міститься у вірусах.

Необхідно відзначити, що в геномі людини є значне число вірусних генів, які накопичувалися в ньому протягом тисячоліть і число яких продовжує неухильно рости. Цей набір вірусних генів у нашому геномі фактично не функціонує, але, можливо, функції цих вірусних генів нам поки ще не-

відомі, особливо з врахуванням того, що природа (або еволюція) «не робить нічого даремно». А це означає – якщо такі гени існують, то це для чогось необхідно. Проаналізувавши ці дані і провівши аналогію із сучасною комп'ютерною технікою, можна сказати, що вірусний геном у геномі людини – це аналог комп'ютерного програмного архіву або резервної бібліотеки.

Віруси як «програмні продукти», мають відкриті портали для введення своєї інформації в біологічні системи, обумовлені механізмом і шляхом передачі вірусної інфекції. Такий підхід до самої суті існування вірусів, а отже до механізмів їх реплікації та збереження в біологічних клітинних системах, дає можливість кардинально змінити уявлення про етіотропну терапію і профілактику вірусних інфекцій.

Схематично процес репродукції вірусів може бути представлений у наступному вигляді: інвазія; розпакування; реалізація генетичної інформації вірусу в клітинній системі; накопичення пулу вірусних геномів і структурних компонентів вірусної оболонки; самозбирання вірусів та їх вихід.

Значна частина вірусів реалізує генетичну інформацію, інтегруючи свій геном (повністю або частково) у геном клітини-хазяїна як прямо, так і опосередковано. Нерідко така інтеграція стає постійною і дає можливість передачі або успадкування вірусного геному в наступних поколіннях клітин-хазяїв. Найбільш важливим у цій ситуації є можливість вірусного інфікування попередників і власне статевих клітин у людини, а отже, й можливість передачі вірусної генетичної інформації нащадкам. Однак у доступних інформаційних джерелах немає даних про такий механізм збереження і передачі вірусів у людини. Також немає даних і про порівняння складу індивідуальних геномів соматичних і статевих клітин людини в процесі її життя. Однак механізм передачі вірусної генетичної інформації від батьків до нащадків вже давно реалізований арбовірусами, наприклад у кліщів, у яких давно відома трансваріальна передача арбовірусів.

Найбільш оптимальним підходом до реалізації таких досліджень було б дослідження геному людини при народженні та порівняння його з геномом його ж статевих клітин на різних часових етапах його життя (через 20-30-50 років). Сьогодні це цілком можливо з врахуванням технологій генетичного аналізу геному, які швидко розвиваються та дозволяють вже сьогодні повноцінно аналізувати індивідуальні геноми (нині в основ-

ному тільки його окремі частини) за рахунок автоматизації та роботизації секвенування й ампліфікації геному.

Одним з найбільш важливих і значимих досягнень у молекулярній біології та біотехнологіях стала розробка і практичне впровадження у 1975 р. біохіміком Ф. Сангером аналізу структури та нуклеотидних послідовностей (н.п.) як окремих генів, так і цілих геномів (секвенування ДНК) поза залежністю від їх походження, а також ампліфікації, принципи якої були розроблені Керрі Мюллісом у 1983 р. – методу клонування ДНК у безклітинній моделі, що дозволяє одержувати необмежене число точних копій первісної ДНК або ДНК-копій вихідної програмної РНК (наприклад, вірусної). На базі цієї моделі у 1986 р. була розроблена і створена вже широко використовувана на практиці полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – автоматизований метод із приладовим забезпеченням (були створені ампліфікатори), які дозволяють за допомогою праймерів і термостабільної ДНК-полімерази з високою точністю виявляти й ідентифікувати специфічні ділянки геномів різних організмів та потім ідентифікувати їх за властивими тільки для них нуклеотидними послідовностями [4].

За останні 20 років секвенування зазнало істотної модернізації у вигляді мініатюризації, автоматизації, роботизації та комп'ютеризації. Сьогодні використовують 4 основних методи секвенсу: модифікований метод Ф. Сангера з детекцією продуктів за допомогою капілярного електрофору; метод подовження ланцюга і легування з детекцією і диференціацією продуктів секвенсу за флуоресцентною міткою, а також перспективний у плані простоти виконання та маючий найбільш високу швидкість – метод молекулярних нанопор, заснований на детекції кожного нуклеотиду за зміною ним електропровідності мембрани, в яку «вмонтована» нанопора. Метод нанопор сьогодні має ще досить високий ступінь помилок при секвенсі, який досягає 0,01 %, але вже сьогодні теоретично дозволяє провести повний аналіз індивідуального людського геному, що складається з більш ніж 3 млрд н.п. протягом 20 год! З використанням інших видів секвенсу ця процедура займає ще кілька тижнів [4, 5].

Сьогодні вже активно застосовуються для наукових досліджень різні види автоматизованих і роботизованих секвенаторів, які використовують різні види секвенсу. Однак існують вже й моделі секвенаторів для практичних цілей (медицина,

біотехнології), які дозволяють досліджувати структуру окремих генів або їх ділянок. Але, незважаючи на такі обмеження, ця технологія вже сьогодні дозволяє одержувати безцінну практичну інформацію про геном людини та патогенних для неї мікроорганізмів, а отже, дає нам можливість й інструмент одержати дані про зв'язок структури нашого геному як з патологією, так і про механізми і види його взаємодії з різними патогенами, які можна з успіхом застосовувати на практиці.

Не стала винятком і ампліфікація. За останній час метод з якісного поступово став напівкількісним, але вже за останні 5-7 років зі зміною підходів до детекції продуктів ПЛР (заміна електрофоретичної детекції як окремого відособленого етапу ПЛР, на детекцію флуоресценції продуктів ПЛР, отриманих з мічених барвником, який флуоресцює, початкових інгредієнтів) – став методом повністю кількісним (найбільш поширена Real-time ПЛР) з відповідною зміною апаратної бази, що стала практично повністю автоматизованою за рахунок роботизації і комп'ютеризації всіх стадій процесу. Практична чутливість методу нині становить 10-50 ДНК-копій/мл. Необхідно відзначити, що вже існує безліч модифікацій кількісної ПЛР і вона продовжує постійно вдосконалюватися – підвищуючи чутливість і специфічність. Сьогодні ПЛР перейшла з розряду методів наукових досліджень у практичну сферу і з урахуванням створення доступних за ціною ампліфікаторів стала вже фактично рутинним дослідженням для багатьох клінік.

На відміну від ПЛР секвенування сьогодні ще немає такого ступеня доступності та ще зберігає наукову спрямованість. Але, незважаючи на це, вже сьогодні секвенаторами укомплектовані великі науково-практичні медичні установи і навіть окремі клініки, що дає їм можливість проводити аналіз різних геномів у прикладних цілях вже для вирішення практичних завдань.

Практичне використання сучасних методів ампліфікації та секвенсу вже в 2003 р. дозволило повністю розшифрувати н.п. у людському геномі [4]. Геноми ж багатьох патогенних бактерій і вірусів були відомі значно раніше, але реального використання цих даних у практичному секторі медицини сьогодні ще фактично нема.

Складається дивна ситуація. Ми маємо величезний і потужний арсенал вже практичних методів і засобів дослідження геномів, але не використовуємо їх на практиці. Найбільш імовірною причиною цьому є вкрай низький рівень знань у

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

галузі молекулярної біології в практичному секторі медицини. Але для сучасного практичного лікаря такі знання вже вкрай необхідні. У першу чергу це стосується сфери інфектології, особливо галузі вірусних інфекцій. Структура геномів багатьох патогенних вірусів вже відома. Ці геноми, як правило, мають невелике число генів, досить просту структуру ДНК або РНК і незначну, порівняно з людським або навіть бактерійним геномом, довжину н.п. Тому структура і н.п. вірусних геномів вже сьогодні може бути з високою точністю досліджена та проаналізована безпосередньо для практичних цілей у клінічній практиці.

Це цілком реально вже сьогодні. Однак для цього необхідно докорінно змінити свідомість представників практичного сектору медицини. Зробити це не так складно. Необхідно ці методи досліджень зробити нормативною базою для практичної медицини. Такий шлях найбільш ефективний. По ньому йдуть, наприклад, у США, де в інструкціях до протипухлинних препаратів, на вимогу FDA, як одна з основних умов їх застосування, вже кілька років назад включене обов'язкове дослідження геному пацієнта (поки за окремими генами), що обумовлено тісним зв'язком токсичності хіміопрепаратів та їх загрозою для життя з індивідуальним геномом пацієнта [6, 7]. Крім цього, сучасна клінічна практика вимагає від лікаря не тільки знання загальної фармакодинаміки і молекулярної фармакокінетики препаратів, а вже сьогодні і їх індивідуальних особливостей для кожного пацієнта, прямо пов'язаних з індивідуальним геномом хворого.

Аналогічна ситуація у свій час відбулася і з ПЛР – від відкритого неприйняття і скепсису на ранніх етапах застосування ПЛР у практичному секторі медицини до насущної сьогодні необхідності використання, яка обумовлена вже офіційними практичними протоколами з діагностики та терапії в інфектології, онкології, венерології та ін. Наведу приклад зі своєї практики. Так, ще в 1994 р., коли в Україні вперше з'явилися напівавтоматизовані ампліфікатори, доступні для клінічних лабораторій, що дало можливість проведення ПЛР для діагностики і контролю ефективності терапії вірусних гепатитів (ВГ), мені довелося зробити доповідь на обласній спілці інфекціоністів про суть методу і молекулярних механізмів ПЛР, а також про способи її практичного використання. Реакція аудиторії практичних лікарів коливалась – від повного нерозуміння до агресивного неприйняття використання ПЛР. Минуло 5 років і ті ж фахівці, так

і не усвідомивши молекулярних основ ПЛР, беззастережно прийняли необхідність її використання як належне, тому що ПЛР на той час вже фактично стала практичним стандартом у діагностиці та терапії ВГ.

На жаль, змінити масову свідомість у практичному секторі медицини вкрай складно, тому що за своєю суттю і принципами діяльності він є досить консервативним, що обумовлено об'єктивними причинами, найважливішою з яких є необхідність забезпечити пацієнтові максимальний рівень безпеки, а впровадження нових технологій у практичну медицину не завжди може її гарантувати в повному обсязі. Тому застосування на практиці реальної можливості використання даних дослідження геномів і використання цих даних у клінічній практиці й надалі буде натрапляти на природний опір, пов'язаний з інертністю практичної медицини.

Так, можливо, сьогодні ці дослідження багатьом ще здаються фантастичними, але досвід показує, що ще вчора було фантастикою, завтра стає реальністю, а з урахуванням темпів розвитку науково-технічного прогресу фантастика багато в чому реалізується вже сьогодні. Саме така ситуація склалась і з методами аналізу геномів. Нам вже давно відомо про єдність генетичних програм в усіх без винятку живих організмах і вірусах як носіїв генетичних програм для свого відтворення. Сьогодні ми маємо потужний інструмент дослідження цього «програмного забезпечення», а також знання законів взаємодії цих програм. За своєю суттю генетична інформація в ДНК і РНК всіх біологічних об'єктів записана у вигляді всього з 4 кодових символів у більшості випадків в лінійному вигляді (4-символьний код – з 4 різновидів нуклеотидів) і сьогодні вона нам практично повністю доступна в цифровому вигляді з можливістю створення цифрових баз даних геномів окремих біооб'єктів. Звідси витікає логічний висновок – ми вже сьогодні маємо необмежені можливості комп'ютерної обробки таких баз даних, а отже і створення моделей окремих геномів, моделей їх взаємодії і прогнозування властивостей біооб'єктів за можливістю реалізації їх генетичної програми. Однак, незважаючи на величезні можливості комп'ютерної обробки таких масивів даних, реальних робіт, що дозволяють використати результати такого аналізу в клінічній практиці, ще немає. Але вже сьогодні все готово для якісного «прориву» досягнень біотехнології в дослідженні геномів для практичного застосування в інфектології, і саме в

тій галузі, що сьогодні вважається найвразливішою і малозабезпеченою – етіотропній терапії вірусних інфекцій.

Сьогодні настала епоха вірусних інфекцій, але арсенал ефективних засобів боротьби з ними вкрай обмежений і, незважаючи на активні наукові розробки, продовжує зменшуватися за рахунок наявності у вірусів природних еволюційних пристосувальних механізмів, які, правда, вже індуковані самим людством, що розробляє і використовує на практиці антивірусні засоби – як засоби «виживання», збереження і одержання «потомства» у несприятливому середовищі. Дуже дивно, що до таких простих біологічних об'єктів, як віруси, які є фактично тільки «крихітними» (іноді включаючи всього по 3-4 гени) геномами, але, правда, здатних до вкрай швидкої і високоефективної еволюції, до цих пір ще не розроблено універсальних підходів і засобів протівірусного захисту. І це за наявності в арсеналі людства глибоких знань про геноми, їх функціонування і взаємодію, а також потужних доступних засобів для маніпуляцій з геномами?!

Пошук ефективних антивірусних препаратів і сьогодні є випадковим і емпіричним з досить рідкими успіхами. На жаль, такий пошук і тепер не є цілеспрямованим, тому що не базується на потужній теоретичній базі, що й спричиняє його реальну хаотичність і не дає очікуваного ефекту. До цього варто обов'язково додати те, що, незважаючи на всю простоту вірусів, вони здатні до швидкої адаптації і вже у найближчий термін після застосування ефективних спочатку протівірусних препаратів, змінюючи свій геном, стають до них нечутливими. Таким чином, ми фактично не «боремося» з вірусними інфекціями, а навпаки, з існуючими сьогодні підходами до розробки протівірусних засобів, ми сприяємо еволюції цих, з однієї сторони, таких «простих», а на ділі таких «складних» біооб'єктів. Як яскравий приклад можна навести застосування ламівудину в терапії гепатиту В [8]. Фактично в галузі розробки і застосування протівірусних препаратів ми сьогодні опинилися в «тупику». Але це тільки уявна безвихідь.

Ще 20 років тому почали закладати теоретичні основи створення протівірусних препаратів, що базуються на знаннях про функціонування і реалізацію вірусних генетичних програм у клітині-хазяї. Найбільш успішними були розробки препаратів на основі антисенсових нуклеотидів (ацикловір і його аналоги), які з успіхом використовують і дотепер. Однак сьогодні розроблювачі таких

препаратів зіштовхнулися з проблемою високої токсичності таких препаратів і незначною різницею між токсичною та ефективною антивірусною дозою таких засобів. Іншою не вирішеною ще проблемою залишається селективний спрямований транспорт антивірусних препаратів у чутливу до даного вірусу клітину. Препарати, що сприяють такому транспорту, також виявилися досить токсичними. Знову ж ми зіштовхуємося з нерозв'язаною проблемою і з необхідністю складного, неефективного емпіричного пошуку.

Із цього випливає тільки один висновок – необхідно кардинально змінювати як теоретичні, так і практичні підходи до розробки антивірусних препаратів. У цій ситуації варто розглянути цю проблему через призму сучасних біотехнологій і сучасних знань про «вірусні програми» і механізми їх реалізації, але з урахуванням багатого досвіду попередніх поколінь, у тому числі й у практичному секторі медицини. У першу чергу, варто звернутися до наступних висновків – «клин клином вибивають» і «подібне лікують подібним» (Парацельс 1493-1541 рр.), а також розглядати функціонування біологічних об'єктів та їх взаємодію як вкрай складні кібернетичні системи, взявши за їх аналога суперпотужні сучасні комп'ютерні системи, тому що вже давно відомо, що принципи функціонування біологічних і комп'ютерних систем як аналогово-цифрових кібернетичних систем – практично однакові. Такий підхід уможливорює використання потужної бази для моделювання і конструювання, максимально наближену до реальних умов і біооб'єктів.

Викладене вище дозволяє використати сучасні досягнення біо- і кібертехнологій у практичній медицині. Найбільш показовими будуть ці технології у практиці терапії парентеральних ВГ. Вже сьогодні має стати рутинною практикою, як і у випадку практичної тактики діагностики та терапії ВГ – дослідження генотипу, «вірусного навантаження», а сьогодні ще й виявлення мутантних форм збудників.

Сьогодні доступність секвенсу дає нам такі можливості:

1. Дослідження «оригінального» геному вірусного збудника або збудників у конкретного пацієнта.
2. Динамічне дослідження геному вірусного збудника у плані виникнення в ньому мутацій, пов'язаних із проведеною протівірусною терапією, або інших «еволюційних» мутацій. Дослідження в геномі збудника виду мутацій, їх рівня і

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

співвідношення між початковим або відомим «диким» геномом збудника з його формою, яка мутувала.

3. Залежно від стану геному збудника (виду мутацій) можливість комп'ютерного моделювання його властивостей, а отже – життєздатності, патогенності і вірулентності.

4. Дослідження можливої інтеграції вірусного геному в геном клітин пацієнта. Як об'єкт вже сьогодні можна використати клітини крові лейкоцитарного ряду або гепатоцити, але це вже пов'язане з необхідністю проведення пункційної біопсії.

5. Підбір ефективних засобів етіотропної терапії залежно від стану геному збудника, тому що вже сьогодні відомо, що віруси з певними мутаціями нечутливі або малочутливі до окремих, раніше ефективних протівірусних препаратів. Такі знання дозволяють уникнути використання неефективних етіотропних засобів, а, отже, запобігти можливим побічним ефектам такої терапії, у першу чергу – токсичним, тому що багато протівірусних препаратів досить токсичні й мають високий рівень побічних ефектів, особливо при одночасному використанні декількох препаратів, що вже давно стало практикою в терапії ВІЛ/СНІДу і ВГ.

Крім цього, знання структури геномів збудників і дослідження їх взаємозв'язку з ефективністю існуючих протівірусних засобів дає нам можливість максимально підвищити ефективність етіотропної терапії, а тому створити «новий стандарт» або підхід до терапії вірусних інфекцій, а саме – початковий підбір для кожного збудника і пацієнта максимально ефективного антивірусного препарату або їх комбінацій.

6. Максимально індивідуалізувати етіотропну терапію вірусних інфекцій, а саме – динамічне дослідження змін у геномі збудника дає нам можливість відповідно змінювати режими і дози вже використовуваних протівірусних препаратів, у разі відсутності можливості заміни їх на більш ефективні засоби.

7. Можливість виділення з біологічних тканин і середовищ хворого нових вірусних збудників. Так, у зразку сироватки крові або іншої тканини хворого виділяють пул ДНК і РНК із наступною їх ампліфікацією та фракційним поділом. Далі проводять секвенування геному пацієнта і н.п. ДНК і РНК, виділених з біологічних зразків обстежуваного. Потім здійснюють комп'ютерний порівняльний аналіз н.п. виділених зразків з геномними базами даних відомих вірусів і геному хворого. На заключному етапі ідентифікують в зразку відомі

вірусні геноми, тим самим одержуючи можливість виявлення нових геномів, не пов'язаних ні з геномом хворого, ні з геномами вірусів, які ідентифікують. Таким чином, ми одержуємо можливість виявлення ще невідомих або істотно модифікованих вірусних геномів.

8. І нарешті, ми одержуємо одну з найважливіших практичних можливостей – повторення і накопичення (клонування) геномів виділених від хворого вірусів, що здійснюється за наявності звичайного ампліфікатора вже в умовах звичайної лікарняної лабораторії, з наступним дослідженням ефективності засобів антивірусної терапії, спочатку в комп'ютерних моделях, а також у модельних експериментах у клітинних і безклітинних системах («in vivo» та «in vitro»). Необхідно зазначити, що це можливо вже сьогодні і в умовах невеликих спеціалізованих вірусологічних лабораторій, наприклад на базі міської або обласної санепідемстанції. Крім цього, маючи вірусний геном, його копії та набір стандартних ендонуклеаз, ми вже сьогодні маємо можливість синтезувати комплементарні до різних ділянок цього геному оліго- або полінуклеотиди з наступним моделюванням на їх базі нових антивірусних препаратів із заданими властивостями, наприклад «міток» активації клітинних ендонуклеаз або засобів доставки незворотних хімічних «зшивок» для вірусного геному. Крім цього, сьогодні існують і способи доставки цих продуктів у заражені клітини – віруси-вектори з «контейнерами» для необхідної генетичної інформації [9]. Є сьогодні і крокуючі по ДНК нанороботи, зібрані з олігонуклеотидів [5, 10], яких треба тільки оснастити інструментом для розпізнавання необхідних ділянок вірусного геному з наступним його «виводом з ладу». Ці ДНК-ові роботи можуть бути багаторазово клоновані (ампліфіковані) у будь-якій лабораторії, що має звичайне діагностичне ПЛР-устаткування.

Все наведене вище – аж ніяк не фантастика. Це сучасна реальність і результат розробки методів і доступного устаткування для ампліфікації та секвенсу геномів. Таким чином, у нас сьогодні є універсальні і, головне, – доступні засоби виділення, аналізу, копіювання та клонування, моделювання різних геномів і маніпуляцій з ними [11, 12]. Також з'явилися і продовжують удосконалюватися та стандартизуватися інструменти для таких маніпуляцій на молекулярному рівні і саме вони вже сьогодні доступні та вкрай необхідні практичному сектору медицини.

Накопичено величезний масив знань про геноми, а отже, неухильно наближається якісний перехід від їх числа до розробки зовсім нових практичних підходів до дослідження, аналізу і маніпуляцій з геномами, що дають нам відчутний практичний ефект [4, 5, 10-12]. Сьогодні з розвитком вже існуючих біо- і нанотехнологій ми стоїмо на реальному порозі якісної зміни нашого «людського» світу та неухильного переходу від світу технічних «машин», нехай навіть дуже досконалих – у світ, поки ще рукотворних, а у недалекому майбутньому самовідтворюваних біологічних машин, наділених штучним інтелектом. Все глибше вивчаючи та пізнаючи біологічний світ і самих себе, ми переконуємося, що всі наші досягнення здебільшого скопійовані із вже існуючих біологічних об'єктів. Сьогодні ми фактично вже пізнали таємницю життя – ми дуже багато знаємо про її першооснови, а саме будову і функціонування геномів як програмних продуктів і першооснови всіх біологічних об'єктів. Наступним якісним кроком буде моделювання «нових» геномів для створення та відтворення біологічних «машин» із заданими властивостями. Адже навіть сьогодні реальністю є ген-модифіковані організми (ГМО). Так, нехай це тільки перші, але ж ефективні й успішні кроки.

Але тут виникає вже нова проблема – проблема генної екології або екології генетичних програм. З урахуванням стрімкого розвитку біотехнологій і вже досить розвинутої, потужної і розповсюдженої біотехнологічної промисловості, а також широким розповсюдженням ГМО, відсутністю сьогодні жорстких критеріїв контролю за біотехнологічним забрудненням – вже виникла проблема генного біологічного забруднення довкілля. Вона існує вже давно, але, на жаль, цього ще не збагнули, тому що немає так необхідних і звичних для усвідомлення проблеми – її видимих і відчутних наслідків. У цьому зв'язку можна провести близьку паралель між генним і радіаційним забрудненням – вони невідчутні, можуть бути вповільнені в часі, але їх негативні наслідки – невідворотні.

Проте вже сьогодні є цілий науково-практичний напрямок «синтетична біологія». Її успіхи вражаючі. Так, вже існують синтетичні біологічні конструкції, здатні вбудовуватися не тільки в бактерійні, але й в еукаріотичні клітини [5, 10, 13]. Крім цього, ще кілька років назад на базі Массачусетського технологічного інституту (США) створений «реєстр стандартних біологічних деталей», що вже містить майже тисячу каталожних зразків у вигляді ділянок генів (промоторів, праймерів, термі-

наторів), плазмід, спеціалізованих білків та ін. [14, 15]. Примітно те, що більшість цих деталей створено студентами в рамках щорічного міжнародного конкурсу «Генетично спроектовані машини». Сьогодні активно розробляються автоматизовані роботизовані системи для комбінації біологічних деталей і конструювання з них різних біологічних систем або підсистем, поки ще молекулярних або органельних. Однак варто вказати, що поки ще більш ефективними виявляються не збирачі, а бактерійні саморегулюючі системи (більш ніж на порядок), здатні сприймати генетичну інформацію, обробляти її і синтезувати необхідний продукт. Таким чином, ми можемо назвати ці бактерійні клітини «клітинами-збирачами» [10, 13]. Але ці збирачі є не чим іншим як генмодифікованими бактеріями, які відомі та використовувані нами в біотехнологічній промисловості (виробництво цитокінів, антибіотиків, антитіл та ін.). Доводиться визнати, що поки робот працює гірше, ніж бактерійні клітини. Але це тільки поки. Провідну роль у створенні таких бактерійних збирачів відіграють векторні технології, що використовуються вже не одне десятиліття. Тому ці технології не є кардинально новими, але очевидно те, що вони вийшли на новий рівень розвитку.

Багато деталей біологічних систем нам ще невідомі, а їх складність занадто велика. Варто сказати, що складні біологічні системи вкрай важко конструювати і контролювати. Тут доречно провести аналогію між простим транзистором і його елементним використанням у різних електронних схемах і надскладними комп'ютерними системами, першоосновою яких є всі ті ж транзистори. Різниця в складності і функціях простої електроніки та комп'ютерів величезна, але вони всі створені тою ж людиною і на фактично одній і тій же елементній базі. Виходячи з цього, можна з упевненістю стверджувати, що створення людиною складних саморегулюючих і самовідтворюваних багатоклітинних біологічних систем всього лише справа часу. Але, незважаючи на це, вже існують і функціонують реальні біосинтетичні системи, що дозволяють одержувати необхідні продукти. Так, наприклад, сьогодні створена штучна система синтезу артемізиніну – вискоєфективного протималарійного препарату [15]. Вона створена як продукт 12 різних генів, нехважаючи на всі складності їх взаємодії. Ця генетична конструкція сьогодні одна з найефективніших у галузі синтетичної біології [15]. Таким чином, ми маємо реальну і доступну для багатьох дослідників практичну базу,

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

у тому числі й апаратну, для конструювання та створення нових ефективних біологічних систем і продуктів з необхідними заданими властивостями.

У своїх попередніх роботах я вже говорив про необхідність кардинальної зміни підходів до проведення противірусної терапії [1]. Такої ж кардинальної зміни вимагає і розробка нових засобів етіотропної терапії вірусних інфекцій. Нині, незважаючи на наукові досягнення в фундаментальних галузях біології, фармакології, практичної біотехнології і нанотехнології, пошук і розробка нових ефективних противірусних препаратів, на жаль, є емпіричними, а одержання ефективних засобів противірусної терапії зараз найчастіше є «щасливою знахідкою», а не логічним, успішним і, головне, – прогнозованим результатом цілеспрямованого наукового дослідження. Однак для цього є об'єктивні причини. Незважаючи на реальну простоту будови, вивчені механізми взаємодії з клітиною-хазяїном, віруси дуже швидко стають нечутливими до найсучасніших противірусних препаратів. Найбільш ілюстративним прикладом цьому може стати ситуація, яка склалася із противірусною терапією хворих на ВІЛ-інфекцію/СНІД. Так, якщо споконвічно така терапія була досить ефективною у випадку застосування одного препарату – азидотимідину (AZT), то сьогодні стандартом терапії стала вже «високоєфективна антиретровірусна терапія» (ВААРТ), що передбачає застосування одночасно 3 і навіть 4 антивірусних препаратів з різним механізмом дії [3]. І навіть до такої потужної й різноспрямованої терапії ВІЛ стає згодом стійким, еволюційно створюючи життєздатні мутації. Аналогічна ситуація складається і в терапії парентеральних вірусних гепатитів, грипу та при інших вірусних інфекціях.

Сьогодні є всі необхідні об'єктивні умови, наведені вище, для «якісної» зміни в цій галузі та створення нового покоління ефективних противірусних препаратів. Все готово для цього, але все ж таки ще не відбулося. Як і раніше, сьогодні намагаються «поліпшити» властивості вже використовуваних препаратів, що по суті є регресивним напрямком досліджень. До противірусної терапії необхідний підхід, аналогічний при проведенні антибактерійної терапії – виділення збудника та найважливіше – визначення його чутливості до етіотропних препаратів. На перший погляд це здається нереальним, але фактично вже широко використовується на практиці. Прикладом може бути етіотропна терапія хворих на гепатит С, де дослідження генотипу збудника є

практично обов'язковим і визначає подальшу тактику противірусної терапії, а саме її якісний склад і тривалість [16-18].

Якщо при багатьох поліетиологічних бактерійних інфекційних захворюваннях (пневмонії, сепсис, гнійні менінгоенцефаліти та ін.), особливо у випадку анаеробної етіології захворювання, бактерійний збудник залишається невідомим – антибактерійна терапія вимушено призначається фактично емпірично препаратами широкого спектру дії з існуючого сьогодні великого арсеналу антибіотиків, то в більшості випадків вірусних інфекцій ми маємо вірогідну й оперативну інформацію про збудника. Однак арсенал противірусних високоєфективних препаратів для системного використання сьогодні залишається досить убогим. Крім цього, не слід забувати і про серйозні токсичні побічні ефекти цих препаратів, що робить визначення чутливості до них збудників не тільки доцільним, але й одним з обов'язкових досліджень, особливо якщо буде потреба проведення тривалої терапії.

Саме чутливість вірусних збудників до етіотропних препаратів є основною проблемою терапії вірусних інфекцій.

Ми ще багато чого не знаємо або, можливо, ці знання були «загублені» раніше! Наша цивілізація за дуже короткий відрізок часу вже створила складні кібернетичні системи – комп'ютери та їх програмне забезпечення. Комп'ютерні системи за своєю організацією і принципами функціонування стають все більше схожими на живі біологічні об'єкти та з кожним новим етапом розвитку ступінь цієї подібності продовжує стрімко рости. У недалекому майбутньому буде створений і штучний інтелект. Ми вже сьогодні стоїмо на порозі цієї події. Фактично ми вже підійшли до реальної можливості створення нового продукту – «самих себе», де як матеріальний субстрат (тіло, органи, системи і тканини) будуть виступати складні інженерні модулі та системи, створені з композитних матеріалів. Як «душа» і носій «генетичної спадкової» інформації, що наділяють ці системи інтелектом і дають їм здатність до мислення та самовідтворення, використовуватимуться комп'ютерні програми, створені людиною разом з «машинами». Саме «спільно», тому що за своєю психологічною суттю нове покоління мислячих систем буде значною мірою залишатися «людьми». Збудуться прогнози та матеріалізуються герої і події творів фантастів. Адже теоретичні основи робототехніки були закладені ще в середині 20 століття А. Азімовим, який ще тоді

сформулював «три основних закони робототехніки» – законів створення і, головне, функціонування «мислячих» роботів [19]. Вони вкрай прості, логічні, а тому універсальні. Головне в них – безпека мислячих систем для людини та собі подібних, а також активне співробітництво і співіснування «нових і саме живих істот» з людською расою. Слід зазначити, що і у цій ситуації збулися прогнози вчених і фантастів про можливість існування та взаємопроникнення один в одного різних форм життя.

Навіть у цьому немає конфлікту з релігією. Адже Творець або Творці створили нас «за своїм образом і подобою» і «дали нам (деяку) волю», у тому числі можливість самим творити «нові форми життя», подібні нам, тим самим наблизивши нас до Творця або Творців.

Виникає доречне запитання. Навіщо необхідний такий екскурс і прогнози? Створивши собі подібних, ми створюємо реальну можливість через максимально наближену і подібну нам модель пізнати самих себе та інтимні механізми нашої взаємодії з біосферою і планетою в цілому, нашу роль і, можливо, зміст нашого існування. Це реальний універсальний механізм і інструмент, який ми поступово, але неухильно опановуємо. Вже сьогодні досягнення сучасних технологій, у тому числі і біотехнологій, дають нам до деякої міри таку можливість. Можливо, у свій час, і ми були такою «моделлю» для наших Творців. Очевидно те, що це не суперечить відомим основним законам розвитку природи і соціуму.

Необхідно також сказати і про те, що, створивши нову «форму життя» (кібернетичні системи), ми задовго до цього вже запропонували і відповідні «інфекційні хвороби» – вірусні програми, здатні до проникнення в кібернетичні системи, реплікації і накопичення в них з наступною передачею через «портالي введення» при взаємодії систем між собою.

Але, незважаючи на «розвиненість» нашої цивілізації і її досягнення, людина як біологічний об'єкт залишається вкрай вразливою. Передусім це стосується загрози з боку вірусів. Незважаючи на гадану простоту організації, структури і особливо геному вірусів, максимальний обсяг якого навіть у «найскладніших» з них не перевищує 200 генів, порівняно з нами (у генетичному апараті людини міститься близько 30 тисяч генів), віруси з неймовірною легкістю і швидкістю можуть вивести чутливий до них складно організований біологічний об'єкт «з ладу», порушивши його функціо-

нування аж до загибелі. Реальних прикладів цьому незліченне число, починаючи з «банальних» респіраторних вірусних інфекцій і закінчуючи ВІЛ/СНІДом, геморагічними гарячками і сказом. Найбільш показовий у цьому випадку нейротропний вірус сказу, який напряду і незворотно уражає клітини вітальних центрів мозку людини та тварин. І якщо при інших, навіть найтяжчих і найнебезпечніших вірусних інфекціях у людини є якийсь шанс вижити, то у випадку захворювання на сказ – загибель біологічного об'єкта неминуча.

Незважаючи на свою «простоту», не будучи навіть за сукупністю ознак «живими» біологічними об'єктами, а лише звичайними невеликими генетичними програмами, які здатні до самовідтворення і, головне, до модифікації в «живих» біосистемах (за рахунок різних видів мутацій), віруси сьогодні становлять реальну загрозу людству як біологічному виду. Передусім за рахунок того, що ми сьогодні, незважаючи на простоту «вірусів», не маємо від них реальних засобів захисту у випадку інфікування та початку вірусної реплікації. Відразу ж виникає логічне запитання – ми керуємо вірусами, чи вони нами? Недарма останнім часом з'являються наукові праці про здатності до колективного мислення у мікробних колоній і асоціацій, що розглядають ці асоціації як багатоклітинні системи, які можна вже розцінювати як цілісний біологічний об'єкт [13]. У мікросвіті є свої віруси – бактеріофаги, а також віруси найпростіших, а отже і вони, їх функції та саме існування можуть керуватися за рахунок вірусів. Фактично віруси в біологічному світі є універсальними регуляторами його діяльності та існування, роль яких нам досі повністю невідома, але сьогодні сприймається нами як негативний фактор. Виняток становлять ті віруси, які використовуються нами в біотехнологіях для створення: засобів боротьби з бактеріями (бактеріофаги); засобів боротьби з окремими біологічними видами (у тому числі з рослинами, тваринами, комахами та ін.); засобів спрямованого переносу та інтеграції генетичної інформації (створення ГМО). Не можна також виключити і роль вірусів у модифікації нашого геному, а отже і їх роль в еволюції людини як біологічного виду.

У чому ж причина нашої беззахисності від вірусної інвазії? Як створити ефективні засоби антивірусного захисту? Одним з можливих шляхів вирішення проблеми може бути створення комп'ютерних моделей, у яких людина буде представ-

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

лена як надскладна біологічна кібернетична система, а віруси – вже існуючими або знову створеними вірусними й іншими «шкідливими» комп'ютерними програмами. Окремі комп'ютерні моделі, незалежно від наведеної проблеми, вже реально існують, але використовуються в іншій галузі знань і діяльності людини.

Так, комп'ютерні противірусні програми – реальна діюча модель нашої імунної системи. Процес розпізнавання «шкідливих» програм (комп'ютерних вірусів), які намагаються впровадитися в «систему» через портали введення із зовнішніх носіїв інформації (дискет, лазерних дисків, зовнішніх «твердих» дисків, глобальної мережі Інтернет), починається з процесу аналізу програмної інформації, що вводиться в систему, і розпізнавання в ній «цілих» вірусних програм або їх «маркерних» ділянок шляхом зіставлення даних про віруси, що втримуються в базі даних антивірусних програм, з інформацією, що вводиться (кодovими послідовностями). У випадку збігу – програма розпізнається як вірусна і до неї застосовуються наступні можливі заходи впливу – видалення, блокування, переміщення в «карантин», заборона на введення та ін. Наведене вище ілюструє й істотну відмінність принципів роботи антивірусних програм від механізмів розпізнавання чужорідної інформації нашою імунною системою. Так, імунна система не може безпосередньо аналізувати та розпізнавати чужорідний генетичний матеріал, а здатна взаємодіяти тільки з його продуктами, як правило, білками або їх складними сполуками (гліко-, ліпо- і рідше нуклеопротейдами), представленими у вигляді антигенів. Таким чином, незважаючи на мільйони років еволюції, складні біологічні об'єкти (ссавці, у тому числі й людина) так і не змогли створити ефективну систему захисту від зовнішньої чужорідної генетичної інформації, що вводиться в них, навіть від її найбільш простих варіантів – вірусів, що містять у своєму геномі мізерне число генів.

Можливо, така система в людини заблокована, можливо, вона нам ще невідома або взагалі відсутня. Однак, якщо така система відсутня або заблокована, то з врахуванням принципу доцільності «еволюційного відбору» природою, така ситуація повинна бути доцільною і переслідувати певну мету.

Фактично ми беззахисні перед вірусною інвазією «невідомими» нашій імунній системі вірусам. Це можуть бути і «нові» віруси, мутанти вже відомих вірусів, а також віруси, створені сучасною біо-

технологією. Стає очевидним, що ми фактично є «відкритою системою» для введення «необхідних» генетичних програм, що використовують у вигляді векторів введення різні віруси. Якщо це саме так, то, таким чином, досить просто «керувати» або навіть модифікувати складні біооб'єкти. Навіщо, кому або чому це потрібно – поки невідомо і не є предметом нашого дослідження. Але варто зазначити, що висловлені припущення вже сьогодні знайшли своє підтвердження в досягненнях сучасної біотехнології. Передусім це стосується створення та широкого розповсюдження на планеті ГМО.

Така «відкритість» і використання принципів функціонування комп'ютерного антивірусного захисту дає нам реальний шанс створити, нехай поки теоретично, реальну систему індивідуального захисту від чужорідної вірусної генетичної інформації. Необхідно використати давно всім відомий принцип, сформульований народною мудрістю, або використовуючи сучасну мову, продукт колективного інтелекту – «клин клином вибивають». Дійсно, комп'ютерні антивірусні програми, активно взаємодіють з іншим програмним забезпеченням, у тому числі і з вірусними програмами або продуктами їх інфікування. Всі ці програми мають той самий код, єдині принципи побудови цього коду в складні програми. Продукти цих програм – також програми з тим же кодом.

Оскільки наше «програмне забезпечення» (наш геном) і геном вірусів мають той же генетичний код, представлений всього лише чотирма нуклеотидами (4 для ДНК і 4 для РНК), а також те, що в клітині при вірусній інвазії відбувається взаємодія геномів клітини та вірусу (фактично генетичних програм), реальним є створення діючої комп'ютерної моделі антивірусного захисту людини і його геному за аналогією з принципами роботи антивірусних комп'ютерних програм.

Підтвердженням такої можливості є практично повна аналогія взаємодії програмних кодів при вірусній інвазії як у комп'ютерне програмне середовище – комп'ютерних вірусів, так і при взаємодії геномів вірусів з біологічними об'єктами. Так, у випадку комп'ютерних програм це взаємодія цифрових кодів, з яких створені ці програми, а в біосвіті цими кодами є біологічні молекули – нуклеотиди. Але в обох випадках це програмні коди! Така глибинна аналогія – першооснова принципів будови комп'ютерних і біологічних об'єктів і дає нам можливість для створення зазначеної вище моделі.

Для цього сьогодні є всі реальні матеріальні способи і засоби. Так, необхідно використати на практиці секвенування патогенних для людини геномів різних вірусів і створити на їх базі реально матеріально існуючі «генетичні антивірусні бази», тобто набори у вигляді «банку» вірусних нуклеїнових кислот (ДНК або РНК).

На наступному етапі для нагромадження таких «інформаційних баз» необхідне використання методів реплікації ДНК і РНК за допомогою вже рутинної ПЛР в її різних модифікаціях.

Таким чином, ми маємо можливість створення необмеженого числа таких баз даних, які можуть постійно і динамічно оновлюватися як «новими» вірусами, так і модифікаціями вже відомих вірусних геномів. Крім цього, такі «бази даних» геномів дають реальну можливість поповнення таких баз імовірнісними новими геномами, отриманими шляхом прогностичного математичного моделювання, які також можуть бути легко матеріалізовані за допомогою ПЛР.

Поряд з реальною базою вірусних ДНК і РНК паралельно необхідне створення і інформаційних комп'ютерних баз даних вірусних геномів, що суттєво розширить можливості прогностичного аналізу. Однак, створення реальних баз вірусних геномів у вигляді баз ДНК і РНК може таїти в собі досить серйозну біологічну небезпеку. Передусім це стосується повноцінних вірусних геномів, здатних до реплікації, транскрипції і трансляції навіть у безклітинних системах, з наступною самозбіркою з утворенням вірусних часток, здатних до інфікування біооб'єктів. Тому створення цифрових комп'ютерних баз даних вірусних геномів може забезпечити необхідну безпеку. Щоправда, необхідне існування і реальних матеріальних баз, що містять власне вірусні геноми. Вирішити проблему безпеки в цій ситуації можна тільки жорстким маркуванням таких геномів, простіше маркуванням їх структурних одиниць, а саме самих нуклеотидів. Такі мітки повинні бути постійними з обов'язковою «забороною» видалення мітки за допомогою молекулярної трансформації і модифікації таких міток за рахунок природних клітинних механізмів. Така система маркування припускає також і обов'язкове створення штучних біологічних структур для розпізнавання цих міток, а також розробку біологічних «засобів» і механізмів руйнування «мічених» нуклеотидів, а також ДНК і РНК, до складу яких вони входять. Найбільш імовірним і оптимальним претендентом на цю роль можна обґрунтовано вважати генно-інженерні фермен-

ти із заданими властивостями, що також сьогодні є цілком реальним і може бути практично реалізоване. Паралельно необхідне створення також клітинних або краще безклітинних систем для їх синтезу та відтворення.

Аналіз наведеного вище матеріалу дозволив сформулювати один з можливих етапних універсальних шляхів оперативного виявлення та ліквідації вірусів в інфікованій «клітині-хазяїні»: 1 – виділення пулу вірусів від хворого; 2 – секвенс пулу вірусних геномів і їх мутантних варіантів; 3 – синтез праймерів для детекції виділених вірусних геномів; 4 – підшивка до праймерів активних «міток» для клітинних ендонуклеаз; 5 – активація клітинних ендонуклеаз.

Пошук універсальних підходів проведення противірусної терапії при величезному поліморфізмі вірусів, насамперед генетичному, та їх здатності до швидких, найчастіше маючих значну еволюційну спрямованість мутацій, проілюстрував необхідність пошуку «слабких місць» вірусної репродукції в клітині, загальних для всього різноманіття цих біологічних об'єктів. Детальний аналіз механізмів репродукції вірусів показав, що найбільш важливими загальними і ключовими етапами вірусної реплікації є транскрипція вірусного геному і його продуктів у вигляді вірусних і-РНК, а також трансляція вірусних і-РНК з утворенням вірусних структурних і неструктурних білків. Саме ці два етапи є найбільш прийнятними та уразливими для застосування універсальних підходів у розробці противірусних препаратів.

Крім цього, найкращим місцем для реалізації активності противірусних препаратів є цитоплазма інфікованої клітини-хазяїна, тому що саме в ній відбуваються основні етапи їх репродукції, а саме трансляція транскрипту і самозбірка вірусів. Адже для багатьох видів вірусів весь цикл їх репродукції відбувається в цитоплазмі.

Так, реплікація геномів ДНК-вірусів і ретровірусів також є універсальним процесом у репродукції вірусів, але відбувається цей процес у ядрі клітини, повністю забезпечується клітинними ферментами і пластичним матеріалом, тому фактично нічим не відрізняється від клітинних фізіологічних і пластичних механізмів, що відбуваються в ядрі клітини. Єдиною значимою відмінністю вірусної реплікації є переважна реалізація вірусного геному за рахунок «перемикання» клітини із синтезу власних ДНК та і-РНК на вірусні, що реалізується за рахунок регуляторної дії «ранніх» вірусних білків (репресорів) на геном клітини-хазяїна. Тому

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

для блокування вірусної реплікації на цьому етапі необхідне блокування власне клітинних механізмів реплікації ДНК, які забезпечують життєдіяльність самої клітини, що робить такий підхід важко реалізованим, принаймні, ще сьогодні. У цьому випадку необхідні вкрай селективні способи та засоби блокування саме реплікації вірусного геному без блокування реплікативних механізмів самої клітини. Такі засоби існують. Наприклад, аномальний нуклеозид ацикловір (9-(2-гідроксietоксиметил)-гуанін), спорідненість якого до вірусної ДНК в 3 000 разів вища, ніж до клітинної. Але це більшою мірою «випадкові» знахідки. Слід також зазначити, що для активації препарату необхідні вірусні ферменти (тимідинкіназа), а також крайню селективність дії ацикловіру, який активний тільки відносно вірусів герпесу 1-2 типів і практично неефективний навіть до інших типів вірусів тієї ж групи. Ці дані ілюструють неможливість використання такого підходу для створення універсальних противірусних засобів.

Також складною проблемою є доставка противірусних засобів саме у клітину. Особливі труднощі має такий транспорт безпосередньо в ядро клітини, де і відбуваються основні процеси реплікації вірусного геному для багатьох видів вірусів.

Це ще раз підтверджує те, що ефективними універсальними антивірусними засобами будуть ті, механізм дії яких буде реалізовуватися в цитоплазмі клітини. Так, вдасться уникнути впливу безпосередньо на реплікативний апарат клітини і блокувати в цитоплазмі вірусний транскрипт (вірусні і-РНК), процеси його трансляції і відповідно самозбірку вірусів. Для вірусів, які реплікуються в цитоплазмі (в основному РНК-ові), можлива розробка універсальних засобів блокування власне вірусної реплікації, аналогічних для блокування вірусного транскрипту, що має ту ж природу, а саме РНК, яка для багатьох вірусів є і геномом, і «ранньою» і-РНК.

Таким чином, найбільш раціональне й універсальне блокування вірусних геномних РНК, а також «зворотних» РНК-ових копій вірусних геномних ДНК та і-РНК (транскрипту), процесів трансляції цих вірусних і-РНК, а отже і синтезу вірусних білків, що дозволить повністю перервати вірусну репродукцію в клітині. Також варто сказати про можливість розробки способів і засобів конформаційної і біохімічної модифікації неструктурних і структурних вірусних білків і їх РНК і ДНК у цитоплазмі, що зможе блокувати самозбірку вірусів –

один з важливих і останніх етапів репродукції вірусів у клітині.

До такого ж висновку прийшла і Природа. Так, еволюція систем противірусного захисту привела до створення й удосконалювання системи генетичного контролю – системи інтерферонів, противірусні ефекти якої реалізуються саме в цитоплазмі за рахунок способів і засобів руйнування вірусного транскрипту та блокування його трансляції. Основними властивостями системи інтерферонів (ІНФ) є: 1 – ІНФ видоспецифічні! і діють в індивідуумів тільки в межах одного виду (людський ІНФ тільки в людини); 2 – β - і γ -ІНФ кодуються в різних хромосомах, а α -ІНФ кодується в одній хромосомі; 3 – ІНФ – це глікопротеїди, але вуглеводна частина ІНФ не відіграє істотної ролі в активності білкової (основної) частини ІНФ; 4 – і-РНК для ІНФ також піддається процесингу або сплайсингу; 5 – гени ІНФ при транскрипції мають праймер, промотор, регулятор транскрипції, екзони та інтрони; 6 – ІНФ мають специфічні рецептори і вони також кодуються певними генами! (це і можуть бути гени, що визначають чутливість до ІНФ!); 6 – в ІНФ два молекулярних шляхи прояву антивірусної активності (наведені нижче); 7 – давно вже відомий (більше 30 років) ген або локус в одній із хромосом (21-й хромосомі), відповідальний за чутливість до ІНФ. Сьогодні оцінку чутливості до ІНФ, точніше можливої ефективності противірусної терапії, визначають за аналізом поліморфізму гену, який кодує синтез λ -ІНФ (ІЛ28В – ІНФ 3-го типу), або ділянці геному, яка лежить поблизу цього гену [2, 20].

ІНФ через вкрай складний каскадний механізм викликає дерепресію окремих з генів і в клітині починається активний синтез ферментів 2,5-олігоаденілатсинтетази та протеїнкінази. Продукт першого ферменту – 2,5-олігоаденілат селективно активує та переключає дію клітинних нуклеаз на вірусний транскрипт, який піддається руйнуванню. Протеїнкіназа після синтезу може додатково активуватися вірусними реплікативними комплексами та двонитковою РНК. Цей фермент фосфорилує α -субодиницю фактора, який ініціює трансляцію (eIF-2), блокуючи функцію цього фактора, чим запобігає синтезу вірусних білків [2, 20]. Протеїнкіназа не має вираженої селективності, а eIF-2 необхідний і для синтезу клітинних, і для синтезу вірусних білків. Однак селективність досягається саме локальною активацією протеїнкінази за рахунок її активації і двонитковими вірусними РНК. Вочевидь, що другий механізм реалі-

зації дії ІНФ досить обмежений у своїй універсальності, тому що вимагає для реалізації саме двониткової вірусної РНК, яку утворюють не всі види вірусів.

Наведене вище доводить те, що створення універсальних засобів блокування вірусного транскрипту та трансляції вірусних білків – саме той шлях, відібраний у процесі еволюції «експериментально» протягом багатьох мільйонів років, що необхідний нам для створення ефективних засобів антивірусного захисту.

Сучасні досягнення молекулярної біології в галузі операцій з РНК і ДНК дозволяють секвенувати і синтезувати практично будь-які нуклеотидні послідовності фактично якої завгодно довжини. Ці можливості дають нам реальний, практичний і унікальний інструмент для аналізу вірусних геномів і синтезу до них комплементарних нуклеотидних послідовностей (назвемо їх антигеномом і анти-транскриптом), здатних селективно зв'язуватися з необхідною послідовністю у вірусному геномі або його транскрипті. Це вже перший крок у створенні селективних антивірусних препаратів.

Зв'язок між вірусною НК або її транскриптом з антигеномом або анти-транскриптом не дуже сильний і може бути дезінтегрований полімеразами або рибосомними комплексами. Для створення сильного зв'язку необхідний хімічний зв'язок між комплементарними ділянками НК або створення в антигеномі й анти-транскрипті «якірних» ділянок, які і будуть хімічно взаємодіяти з первинної ДНК, РНК або їх транскриптом. Такі роботи були проведені більше 10 років тому і ці «якірні» ділянки були названі інтеркаляторами [20, 21]. Однак цей шлях створення антивірусних засобів виявився нездійсненним внаслідок низької селективності інтеркаляторів, які блокували і НК клітини-хазяїна, а необхідні для інтеркаляторів противірусні концентрації виявилися цитотоксичними. Необхідно також відзначити, що вільний транскрипт (не пов'язаний з рибосомами) у вигляді і-РНК, незважаючи на його «захищеність» від нуклеаз, швидко руйнується в клітині. В середньому період життя вільної і-РНК у клітині не перевищує 5-6 хв. [22], що створює додаткові складності для ефективного впливу на ці НК антивірусними препаратами.

Важко переборним бар'єром для реалізації цього шляху створення антивірусних препаратів є складність доставки таких антигеномів і анти-транскриптів у клітину через її мембранні утворення і селективний активний транспорт, не призначений для цих олігонуклеотидів. Але, незважаю-

чи на це, саме цей напрямок конструювання противірусних засобів дозволяє вкрай індивідуально підходити до створення антивірусних препаратів до будь-яких варіантів вірусів, що навіть швидко змінюються (мутують). Залишається вирішити проблеми з доставкою антигеномів і анти-транскриптів у клітину, створення їх міцного зв'язку з первинної ДНК, РНК і їх транскриптами, а також селективну і локальну активацію клітинних нуклеаз, які швидко зруйнують вірусні ДНК, РНК і їх і-РНК.

Проблему доставки антигеномів і анти-транскриптів у клітину можна вирішити за допомогою векторних вірусних технологій, які дозволяють доставляти необхідний геномний матеріал у клітину, що може в ній реплікуватися та транскрибуватися.

Таким чином, ми впритул підійшли до вирішення проблеми створення універсальних і індивідуальних антивірусних засобів. Дійсно, сьогодні ми маємо можливість реальної практичної векторної доставки необхідного генетичного (інформаційного) матеріалу в клітину [1, 9, 10], минаючи вкрай складний шлях введення в неї та її структури вже готових антивірусних продуктів, що у більшості випадків просто неможливо. Вже сконструйовані реально діючі молекулярні олігонуклеотидні нанороботи, здатні специфічно зв'язуватися з певними ділянками ДНК і здійснювати по ній понуклеотидний рух [9, 10]. Сьогодні ми можемо внести в «контейнерні зони» вірусів-векторів інформацію для синтезу білків, ферментів, в тому числі і ендонуклеаз [9, 10]. Крім цього сьогодні ми також маємо можливість комп'ютерного моделювання різних білків зі спеціальними сайтами зв'язування та спеціалізованими вузько спрямованими функціями.

Отже, сьогодні фактично вирішені 3 основні проблеми для створення універсальних антивірусних засобів: 1 – можливість векторної доставки інформації, необхідної для створення (синтезу) у клітині антивірусних компонентів; 2 – можливість нагромадження в клітині за рахунок природних процесів реплікації та транскрипції молекулярних олігонуклеотидних нанороботів (про яких наведено вище); 3 – можливість синтезу в клітині, також за рахунок реалізації генетичної «програми» вектора і природних процесів транскрипції та трансляції, необхідних білкових структур, що володіють специфічним зв'язуванням з антивірусним комплексом і вірусними НК, а також володіють у відношенні вірусної ДНК і РНК

ДИСКУСІЇ ТА РОЗДУМИ

нуклеазною активністю, яка дозволяє специфічно руйнувати пул вірусних НК.

На практиці це буде реалізовано в такий спосіб. У контейнерні зони вірусу-вектору вносять генетичну інформацію про всі компоненти антивірусного комплексу, які наведені вище. Далі вектор практично безперешкодно і головне локально та вкрай специфічно за рахунок рецепторної взаємодії із клітиною вносить у неї необхідну генетичну інформацію про синтез компонентів антивірусного комплексу. Після цього відбувається реалізація цієї інформації за рахунок синтезу пулу молекулярних олігонуклеотидних нанороботів зі специфічними сайтами зв'язування і синтезу еквівалентного пулу необхідних рецепторних білків і нуклеаз. Далі можлива самозбірка антивірусного комплексу та пошук ним у клітині вірусних НК. Після цього відбувається розпізнавання на цих НК певних, суворо специфічних саме для даних вірусних НК сайтів з нуклеотидів, посадка на них цілого антивірусного комплексу або наноробота з наступним приєднанням до нього векторної нуклеази і з'єднувальних білків. Після цього комплекс або сам наноробот рухаються до певної ділянки вірусної НК, де векторна нуклеаза проявляє свою активність, дезінтегруючи вірусний геном або його транскрипт, припиняючи тим самим репродукцію патогенного вірусу.

Такий підхід дасть можливість і шанс на життя хворим, інфікованим смертельними вірусами. Передусім це стосується сказу, перед яким людство залишається ще абсолютно безсилим (у випадку розвитку хвороби). Крім цього, описаний підхід може використовуватися і як потужний засіб профілактики гострої вірусної інвазії, правда, з необхідністю наступної імунізації. Варто також сказати і про використання цього підходу до дії на пухлинні клітини з метою регуляції їх життєвого циклу.

Віруси-вектори та внесена ними в клітину генетична інформація повинні бути безпечними для здорової неінфікованої патогенними вірусами клітини, а також можуть бути розпізнані і вилучені з неї за рахунок природних біологічних процесів, що відбуваються в клітинах. Тому однією з умов безпеки такої технології повинне стати особливе маркування компонентів антивірусного комплексу (як нанороботів, так і білків), що дозволяє відрізнити їх від функціональних і морфологічних елементів клітини-хазяїна. Це дозволить, якщо буде потреба, виявити такі комплекси в клітині і успішно їх дезінтегрувати або видалити (питання безпеки частково були розглянуті вище). Пере-

фразовуючи 3 основні закони робототехніки, що забезпечують безпеку нових технологій для людини у плані створення векторних антивірусних комплексів, їх можна викласти наступним чином:

1) технологія не може заподіяти шкоду людині або своєю бездіяльністю допустити, щоб людині була заподіяна шкода;

2) технологія повинна бути повністю керована людиною, крім тих випадків, коли це суперечить пункту 1;

3) технологія як біологічний об'єкт, може мати можливість для самозбереження та репродукції в тій мірі, у якій це не суперечить пунктам 1 і 2.

Саме ці положення зможуть зробити для нас нові векторні технології керованими, а головне – безпечними.

Наведене вище яскраво ілюструє реальність і швидко практичну реалізацію універсального підходу в створенні нових антивірусних засобів, які мають ту ж природу, що і збудники вірусних хвороб. Необхідні спільні зусилля фахівців в галузі молекулярної біології, вірусології, генетики і фахівців з клінічної інфектології для прискорення та практичної реалізації проекту, результатом якого буде створення вискоелективних та індивідуальних антивірусних препаратів.

Література

1. Бондаренко А.М. Лікування гепатиту С – фармакологічна лотерея? / А.М. Бондаренко // Інфекційні хвороби. – 2009. – № 2. – С. 94-104.
2. Букринская А.Г. Молекулярные основы патогенности вирусов / А.Г. Букринская, В.М. Жданов. – М.: Медицина, 1991. – 256 с.
3. Пандемический грипп 2009 г. в России. Диагностика и молекулярно-биологические характеристики вируса / М.Ю. Еропкин, Т.М. Гудкова, Д.М. Даниленко и др. // Вopr. вирусологии. – 2011. – № 1. – С. 17-21.
4. Черч Дж. Каждому по геному / Джордж Черч // В мире науки. – 2006. – № 4. – С. 30-39.
5. Нейдриан Симан. Двойная спираль / Нейдриан Симан // В мире науки. – 2004. – № 9. – С. 23-31.
6. Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика / В.Г. Кукес. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 248 с.
7. Имянитов Е.Н. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой цитостатической терапии / Е.Н. Имянитов, В.М. Моисеенко // Онкогематология. – 2007. – № 3. – С. 4-8.
8. Комбинированная терапия больных хроническим вирусным гепатитом В, резистентных к лечению ламивудином / И.П. Баранова, А.А. Шульдяков, М.Х. Турьянов и др. // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии. – 2006. – № 2. – С. 7-13.
9. Научные разработки НИУ РАМН – практическому здравоохранению / Под ред. М.И. Давыдова. – Москва, 2004. – Вып. 4. – 224 с.

10. Нанотехнологии. Азбука для всех / Под ред. Ю.Д. Третьякова. – М.: Физматлит, 2008. – 368 с.
11. Бененсон Я. Компьютеры из ДНК / Я. Бененсон, Эхуд Шапиро // В мире науки. – 2006. – № 9. – С. 35-41.
12. Макдональд Дж. Для работы и развлечений / Дж. Макдональд, Д. Стефанович, М. Стоянович // В мире науки. – 2010. – № 3. – С. 63-72.
13. Биофабрики будущего / Д. Бейкер, Р. Вейс, Д. Джекобсон и др. // В мире науки. – 2006. – № 9. – С. 26-34.
14. Baker M. Synthetic genomes: The next step for the synthetic genome / Monya Baker // Nature. – 2011. – Vol. 473, N 7347. – P. 403-408.
15. Kwok R. Five hard truths for synthetic biology / R. Kwok // Nature. – 2010. – Vol. 463, N 7279. – P. 288-290.
16. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection / Huang Y., Yang H., Borg B.B. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) USA. – 2007. – Vol. 104, N 3. – P. 985-990.
17. Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy / M.W. Taylor, T. Tsukahara, L. Brodsky et al. // J. Virology. – 2007. – Vol. 8. – P. 3391-3401.
18. Hepatic gene expression and prediction of therapy response in chronic hepatitis C patients / N. Selzner, L. Chen, I. Borozan et al. // J. Hepatology. – 2008. – Vol. 48, N 5. – P. 708-13.
20. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии / Ф.И. Ершов. – М.: Медицина, 1996. – 240 с.
20. Азімов А. Я, робот / Айзек Азімов : Пер. с англ. – К.: Веселка, 1987. – 271 с.
21. Скрипаль І.Г. Теорія і практика створення антисигнальних олігодезоксирибонуклеотидів як універсальних антимікробних засобів / І.Г. Скрипаль // Мікробіол. журнал. – 1997. – Т. 39, № 5. – С. 67-82.
22. Стайер Л. Биохимия: в 3-х т. / Л. Стайер : Пер. с англ. – Т. 3. – М.: Мир, 1985. – 400 с.

PROSPECTS OF THE DEVELOPMENT OF WAYS AND MEANS OF ANTIVIRAL THERAPY

A.M. Bondarenko

SUMMARY. In the article the analysis of application of basic modern means and methods of antiviral therapy, modern biotechnologies, achievements of molecular biology and genetics is made. On the basis of these data the author gives practical ways and means of antiviral therapy and prospect of their development in the future. Special attention is given to vector technologies. The necessity of active search of new means and methods of antiviral therapy is proved.

Key words: antiviral therapy; biotechnologies.

Отримано 1.08.2011 р.