

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 576.8

К. О. Овнанян

**Вирусы-эндосимбионты паразитических и свободноживущей энтамеб:
ультраструктурный и морфометрический анализ**

(Представлено академиком К.Г.Карагезяном 7/Х 2008)

Ключевые слова: *вирусы, энтамеба, симбионты, ультраструктура, микроскопия*

Простейшие и беспозвоночные являются объектом постоянного внимания вирусологов и микробиологов в качестве модели для изучения системы взаимоотношения вирус-прокариот-эукариотическая клетка [1-4] за исключением *Ent. histolytica* – единственной из простейших, у которой была идентифицирована вирусная природа вирусообразных частиц [5]. Доказать вирусную природу частиц-симбионтов, морфологически напоминающую рабдовирусы [6, 7], до настоящего времени не представлялось возможным. В связи с недостаточной изученностью вышеуказанных вопросов становится крайне необходимой разработка новых методических подходов, в том числе и статистических, по идентификации ранее неизвестных наноструктур вирусов, в частности их аномально измененных форм. В данной работе в свете современной нанобиологии нами сделана попытка охарактеризовать природу эндосимбиотических вирусоподобных частиц с применением нового подхода.

В качестве объектов исследования были использованы вегетативные формы и цисты разных штаммов паразитических и свободноживущей энтамеб из рода *Entamoeba*: *Ent. histolytica*, выделенная от больных и цистоносителей; патогенная для рептилий *Ent. invadens*, выделенная от рептилий; *Ent. moshkovskii*, изолированная из сточных вод, а также биоптаты слизистой оболочки больных кишечным амебиазом.

Для изучения изолированных особей вирусов-симбионтов применяли методы как негативного контрастирования 2% раствором фосфорновольфрамовой кислоты при рН 6.8-7.0, так и изучения крио- и ультратонких

срезов. Для изоляции симбионтов производили предварительное разрушение культуры простейших 3-кратным замораживанием с последующим оттаиванием и центрифугированием. Для подготовки электронно-микроскопических препаратов культуры простейших и биообразцы фиксировали 2.5% раствором глутаральдегида или смесью параформальдегида, глутаральдегида и пикриновой кислоты [8] с дальнейшей постфиксацией четырехокисью осмия, обезвоживанием, пропиткой-полимеризацией в смолах аралдита. Получение криосрезов и ультратонких срезов исследуемого материала проводили на ультрамикротоме "LKB - 8800" с криоприставкой "Kryokit-14800" (LKB, Швеция), а просмотр препаратов – на просвечивающих электронных микроскопах (ПЭМ) TeslaBS-500 (Чехословакия) и JEM-100B (Jeol, Япония). Компьютерный морфометрический анализ электронно-микроскопических изображений проводили по программе "Видео-тест, структура-5, нанобиология".

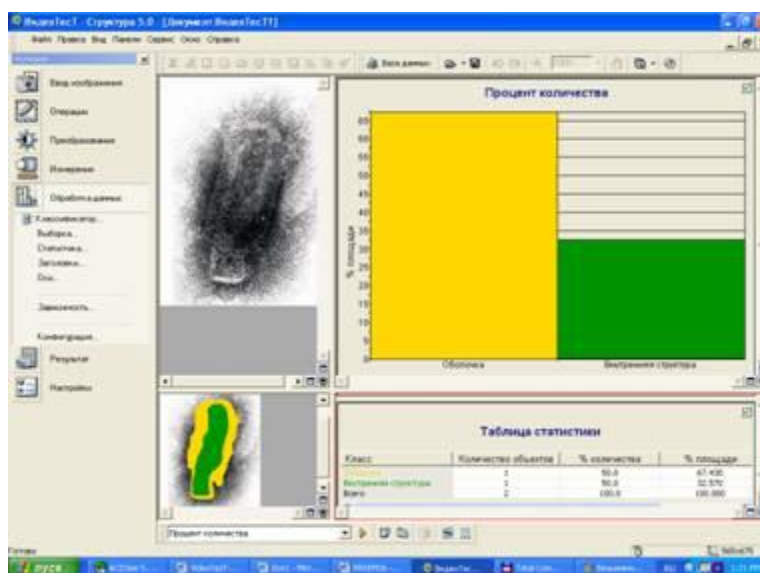


Рис. 1. ПЭМ. Вирус-эндосимбионт энтамеб (негативное контрастирование). Ув.50000. Видео-тест-структура 5,0, нанотехнология.

Результаты электронно-микроскопических исследований ультраструктурной организации трофозоитов и цист паразитических *Ent. histolytica*, *Ent. invadens*, а также свободноживущей амёб *Ent. moshkovskii* свидетельствуют о присутствии в цитоплазме всех видов энтамеб вирусов-эндосимбионтов. Структурные особенности последних у трофозоитов всех видов энтамеб и гематофагов *Ent. histolytica* характеризуются цилиндрическим пулевидным строением (рис. 1). С применением методов негативного контрастирования и криоультрамикротомирования энтамеб, а также методов замораживания

и оттаивания клеток простейших с последующим центрифугированием на препаратах были идентифицированы вирусы-симбионты энтамеб. Частицы палочковидной формы, длиной 180-200 нм и диаметром 60-70 нм, которые располагались в цитоплазме одиночно и в виде розеток, по своему тонкому строению стоят ближе к рабдовирусам [3, 6, 7] и сигма-частицам, обнаруженным у *Drosophila melanogaster* [9].

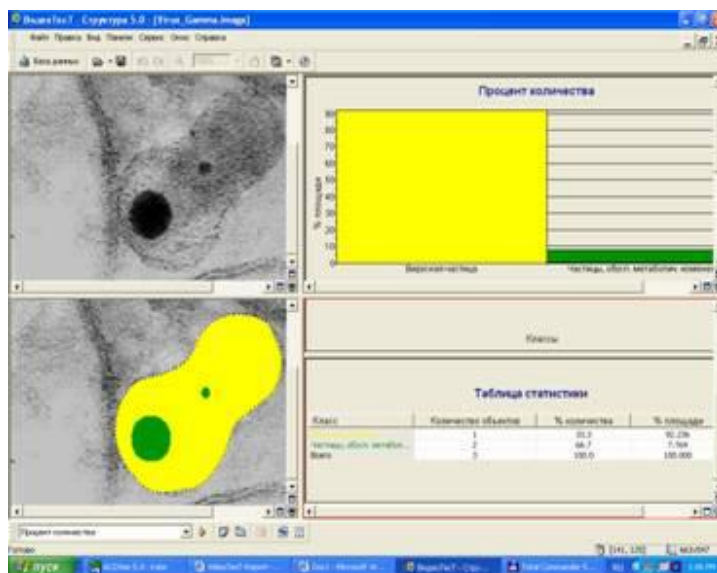


Рис. 2. ПЭМ. Вирус-эндосимбионт энтамеб после γ -ионизирующего излучения. Ув.50000. Видео-тест-структура 5,0, нанотехнология.

Результаты проведенных нами электронно-микроскопических исследований по выявлению действия летальных доз (10000 Грей) γ -ионизирующего излучения на культуру энтамеб подтвердили наличие наноструктур на фоне разряженной цитоплазмы и ядра. У симбионтов, подвергшихся ионизирующему облучению, в отличие от исходных культур было установлено трехслойное строение оболочки наноструктур, отходивших у части особей от нуклеоида толщиной 9-10 нм. Вместе с тем в центральных зонах наноструктур просматривается осмиофобный канал, а у отдельных частиц и электронноплотные гранулы с диаметрами 5-35 нм (рис. 2), напоминающие гранулы кальция [10]. При этом согласно морфометрическим исследованиям длина симбионтов после облучения устанавливается в пределах 160 нм, диаметр — 94 нм, общая площадь — 11036 нм², причем диаметр их большой гранулы составляет 35 нм, площадь — 885 нм², а диаметр маленькой — 8 нм, площадь — 45 нм².

У цист *Ent.histolytica*, выделенных от цистоносителя путем флотации, при

последующем электронно-микроскопическом исследовании удалось установить в цитоплазме простейшего упаковку бактериофагов (рис. 3).

Полученный нами фактический материал позволяет считать возможным наличие вирусов-симбионтов в клетках паразитических и свободноживущих видов энтамеб, что позволяет использовать их в качестве модели для изучения особенностей действия различных физических, химических и биоорганических агентов на наноструктуры биологической природы.

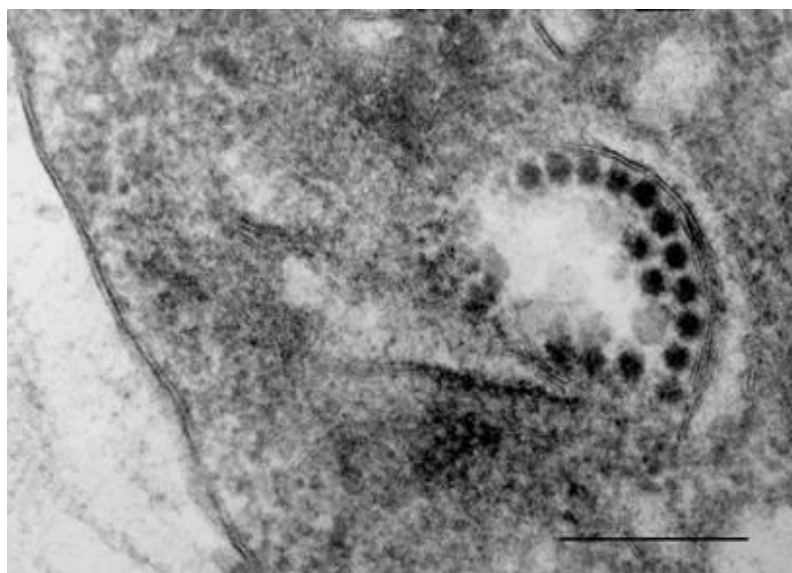


Рис. 3. ПЭМ. Бактериофаги в цисте *Ent.histolytica*. Ув.50000.

Таким образом, вирусоподобные эндосимбионты по своим размерам и ультраструктурной организации уподобляются рабдовирусам. Специфика их обнаружения лишь у паразитических и свободноживущей энтамеб может играть роль маркера для идентификации и систематики энтамеб. Применение γ -ионизирующего излучения в качестве экстремального фактора служит основанием для детализации определения ультраструктуры эндосимбионта и уточнения как ультраструктурных патологические изменения симбионтов, так и их склонности к расположению вокруг аутофагосомальных вакуолей клетки энтамеб [11]. Ультраструктурные патологические изменения вирусов-эндосимбионтов под воздействием γ -ионизирующего излучения проявляются как в клеточных мембранных структурах и в нуклеоиде, так и в образовании электронноплотных продуцентов — гранул, элиминируемых из особи вирусоподобных частиц.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение о правомерности применения в цитологии вирусов программных морфометрических методов, что служит основанием для статистического

анализа структурных изменений вирусов-эндосимбионтов с целью использования их для идентификации вирусов и их аномальных форм.

Институт молекулярной биологии НАН РА

К. О. Овнаниян

**Вирусы-эндосимбионты паразитических и свободноживущей энтамеб:
ультраструктурный и морфометрический анализ**

Для электронно-микроскопического исследования вирусоподобных эндосимбионтов паразитических и свободноживущей энтамеб и их наночастиц были использованы методы негативного контрастирования, ультрамикротомирования, криоультрамикротомирования, морфометрии по программе "Видео-тест, структура-5, нанотехнология".

Результаты проведенных исследований подтвердили идентификацию вирус-эндосимбионтов паразитических и свободноживущей энтамеб, были выявлены ультраструктурные изменения под действием γ -ионизирующего излучения мембран, нуклеоида, формирование и выход электронноплотных гранул из вирусоподобных частиц. В цистах *Ent.histolytica* были обнаружены скопления бактериофагов. Используемую морфометрическую программу можно применить при идентификации вирусов и их аномальных форм.

Կ.Օ. Նովնանյան

**Մակարոյժ և ազար ապրող էնթամեորաների վիրուսանման էնդոսիմբիոնտներ՝
ուլտրակառուցվածքային և կազմաչափական վերլուծություն**

Մակարոյժ և ազար ապրող էնթամեորաների վիրուսանման էնդոսիմբիոնտների և դրանց նանոմասնիկների էլեկտրոնամանրադիֆրակային ուսումնասիրությունում օգտագործվել են բացասամեր ցայտերանգման, ուլտրանուրբ մասնահատման, կրիոուլտրանուրբմասնահատման և «Տեսա-թեստ, կառուցվածք-5, նանոտրեխնոլոգիա» ծրագրով համակարգչային կազմաչափական, վերլուծման եղանակները:

Կատարված հետազոտությունների արդյունքները հաստատվեցին մակարոյժ և ազար ապրող էնթամեորաների վիրուս-էնդոսիմբիոնտների իդենտիֆիկացիան: Բացահայտվել են վիրուսանման էնդոսիմբիոնտների վրա γ -իոնիզացնող ճառագայթման ազդեցության փակ թաղանթների, նուկլեոիդի, էլեկտրոնափխր նանոհատկաների ձևավորման և վիրուսանման մասնիկներից արտազատման ուլտրակառուցվածքային փոփոխությունները: *Ent.histolytica*-ի ցիստաներում հայտնաբերվել են բակտերիոֆագերի կուրակումներ: Օգտագործված համակարգչային կազմակերպչական ծրագիրը կարելի է կիրառել վիրուսների և դրանց փոփոխված ձևերի իդենտիֆիկացիայի համար:

K. O. Hovnanyan

Viruses-Symbionts of Parasitic and Free-Living Entamoeba: Ultrastructural and Morphometrical Analysis

For electron-microscopic studying virus-like symbionts and their nanoparticles the methods of negative contrastings, both cryo- and ultrathin sections, computer morphometrical analysis under the program the "Video-test, structure-5, nanotechnology" are applied. As a result of the lead researches similarities a virus-symbionts free-living and free-living entamoebas are established. The ultrastructural pathological changes of viruses-symbionts under influence scale of an γ -ionizing – radiation are established both in cellular membranes structures, and in nucleoid, and also in formation electrondens granules in virion, eliminations from the individual virus-like particles. The presence of bacteriophags in cysts of Ent.histolytica is established. The morphometrical program is possible to use for the identification of viruses and their abnormal forms.

Литература

1. *Авакян А.А., Быковский А.Ф.* Атлас анатомии и патогенеза вирусов человека и животных. М. Медицина. 1970. 269 с.
2. *Быковский А.Ф., Ершов Ф.Е., Кармышева В.Я., Блюмкин В.Н., Миронова Л.Л. и др.* Атлас вирусной цитопатологии . Пед. ред. В.М.Жданова. М. Медицина. 1975. 260 с.
3. *Vagner R.* In: Fundamental Virology. Second Ed., ed. by B.N.Field, D.M.Knipe et al. Raven Press, LTD, New York. 1991. P. 489-503.
4. *Fong C.K., Gross P.A., Hsiung G.D., Swack N.S.* - J. Clin. Microbiol. 1975. Feb. N1(2). P. 24.
5. *Mattern C.F.T., Diamond L.S.C., Daniel W.A.* - J.of Virology. 1972. V. 9. P. 342-358.
6. *Bird R.G., McCaul T.F.* - Ann. Trop. Med. Parasitol. 1976. V. 70. P. 81-93.
7. *Hovnanyan K.O.* In: Proceedings 7th Congress of APPEM - 2000. Singapor. 2000. P. 141-142.
8. *Ito S., Karnovsky M.J.* - J. Cell Biol. 1968. V. 39. P. 168A-169A.
9. *Маргелис Л.* Роль симбиоза в эволюции клетки. М. Мир. 1982. 456 с.
10. *Cisar J.O., Hu D.Q., Thompson J., Swaim W., Hu L., Коперско D.J.* - J. Proc. Nat. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 1511-1515.
11. *Овнанян К.О., Любимова Л.К., Иванова Л.Н., Сухарева-Немакова Н.Н.* - Антибиотики. 1987. N 12. С. 903-906.