

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 576.8

К. О. Овнаниян

**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 вирусобразных 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 pH 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".

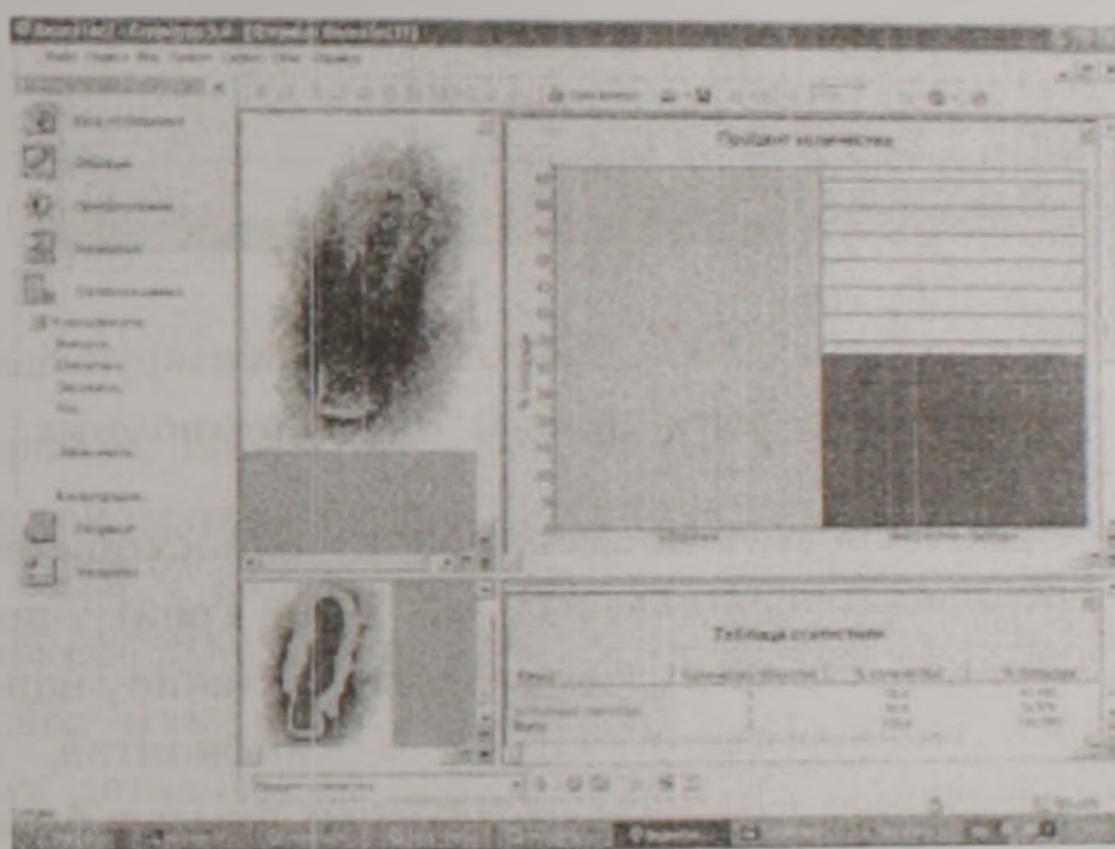


Рис. 1. ПЭМ. Вирус-эндосимбионт энтамеб (негативное контрастирование). Ув.50000. Видео-тест-структура 5,0, нанотехнология.

Результаты электронно-микроскопических исследований ультраструктурной организации трофозоитов и цист паразитических *Ent. histolytica*, *Ent. invadens*, а также свободноживущей амеб *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].

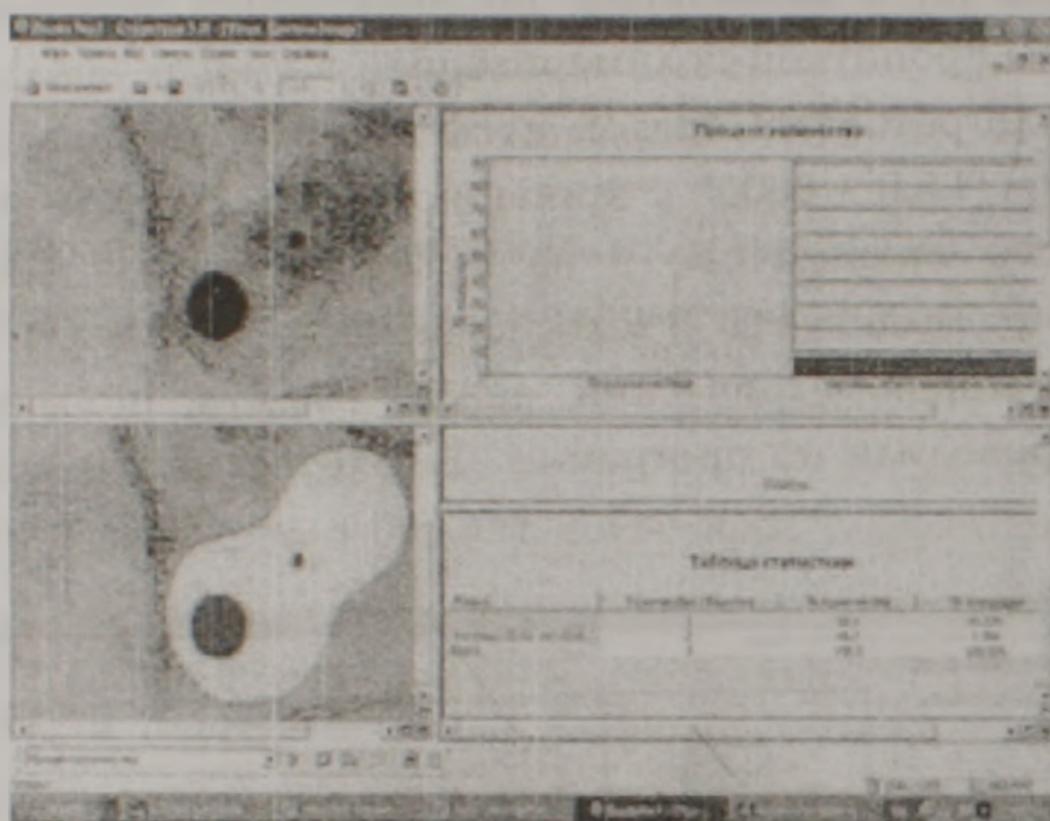


Рис. 2. ПЭМ. Вирус-эндосимбионт энтамеб после γ -ионизирующего излучения. Ув 50000. Видео-тест-структура 5,0, нанотехнология.

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.

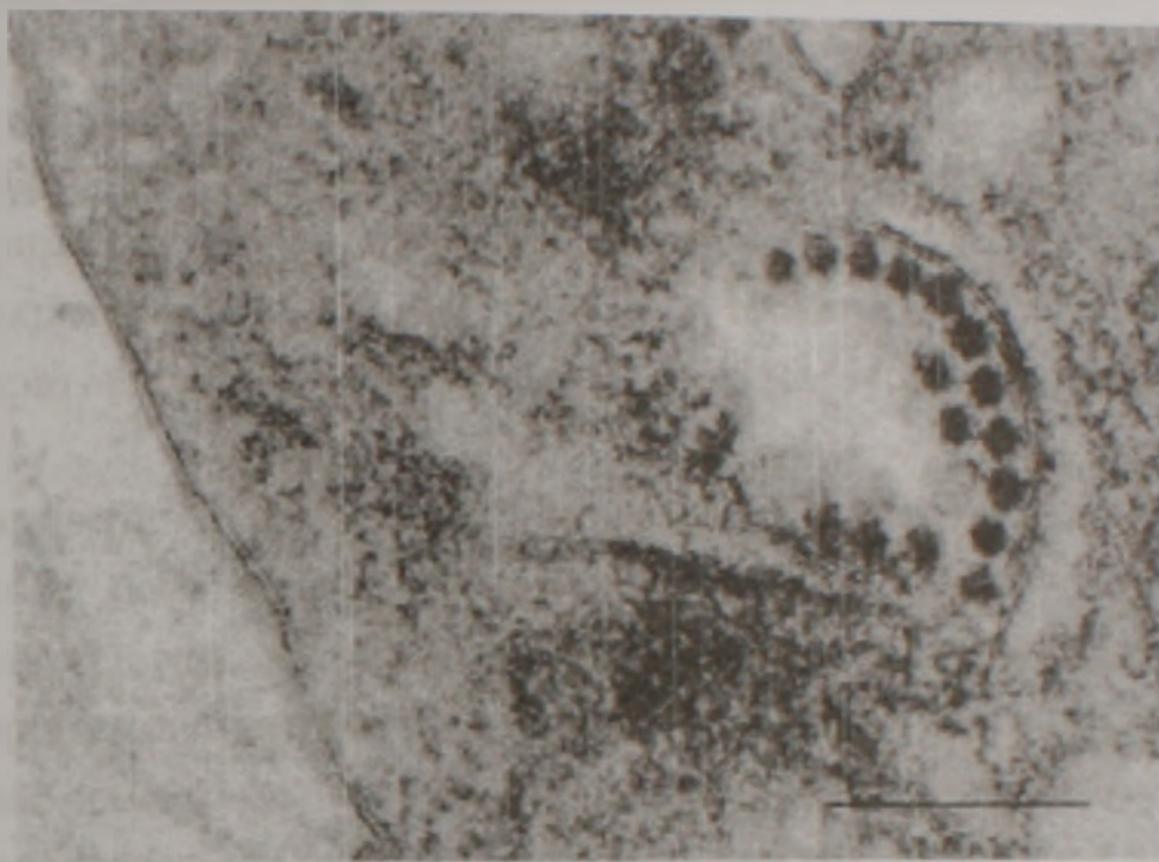


Рис. 3. ПЭМ. Бактериофаги в цисте *Ent. histolytica*. Ув. 50000.

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 патологических изменения симбионтов, так и их склонности к расположению вокруг аутофагосомальных вакуолей клетки энтамеб [11]. Ультраструктурные патологические изменения вирус-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 РАН 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, нуклеида, 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

Մակարոյձ եւ ազատ ապրող էնֆամեոբաների վիրուսանման էնդոսիմբիոնտներու վերակառուցվածքային եւ կազմաչափական վերլուծություն

Մակարոյձ եւ ազատ ապրող էնֆամեոբաների վիրուսանման էնդոսիմբիոնտների եւ դրանց շանոմասնիկների էլեկտրոնամանրադիֆրակային ուսումնասիրությունում օգտագործվել են բազասամետր ցայտերանգման, ուլտրանուրբ մասնահատման, կրիոուլտրանուրբմասնահատման եւ «Տեսա-թեստ, կառուցվածք-5, նանոպեխնոլոգիա» ծրագրով համակարգչային կազմաչափական, վերլուծման եղանակները:

Կարարված հեֆագոֆությունների արդյունքները հաստատեցին մակարոյձ եւ ազատ ապրող էնֆամեոբաների վիրուս-էնդոսիմբիոնտների իդենտիֆիկացիան: Բացահայտվել են վիրուսանման էնդոսիմբիոնտների վրա γ -իոնիզացնող ճառագայթման ազդեցության փակ թաղանթների, նուկլեոիդի, էլեկտրոնախիտ 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 bacteriophages 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.А. 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 APEM - 2000. Singapor. 2000. P. 141- 42.
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., Корепско D.J. - J. Proc. Nat. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 1511-1515.
11. Оенанян К.О., Любимова Л.К., Иванова Л.Н., Сухарева-Немакова Н.Н. - Антибиотики. 1987. N 12. С. 903-906.