

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 576.858 + 576.89:616.092.4

Г. Е. Восканян<sup>1</sup>, А. Т. Тусузян<sup>2</sup>, Д. Ш. Манучарян<sup>2</sup>, З. А. Каралян<sup>1</sup>

Взаимоотношения вируса энцефаломиокардита с *Paramecium aurelia*

(Представлено чл.-кор. НАН РА Ж.И. Акопяном 13/II 2009)

Ключевые слова: *Paramecium aurelia*, EMCV

Одной из возможных клеточных систем в экологии вирусов различных типов могут быть разнообразные одноклеточные организмы включая простейших [1-4]. Характер взаимодействия вируса с простейшим может быть двояким: с одной стороны, простейшее может служить разновидностью клетки-хозяина для вируса, с другой – вирус может инактивироваться простейшим [5, 6].

Концентрация вирусов в окружающей среде зависит от баланса двух факторов: скорости размножения и распада (деградации) вирусов. Под распадом понимают разные процессы: разрушение вирионов, поглощение их организмами, любой вывод вирусов из среды обитания, а также уменьшение со временем числа вирусных частиц, способных заражать клетки-хозяева. В наших исследованиях использован вирус энцефаломиокардита EMCV (семейство Picornaviridae, род *Cardiovirus*). Он принадлежит к вирусам, имеющим весьма широкий спектр хозяев, среди которых значительное количество составляют млекопитающие, в том числе и человек [7], и может вызывать эпидемии и массовую гибель сельскохозяйственных животных, в первую очередь свиней [8].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей экологии EMCV, возможностей его выживания в системе простейшее – вирус.

**Материалы и методы.** Вирус энцефаломиокардита EMCV (штамм Columbia-SK), полученный из Института вирусологии РАН (Москва), использовался в дозе 0.1 TCD<sub>50</sub> на клетку на 48-часовом монослое клеточной культуры. Опыт проводился при 37<sup>0</sup>C. Вирусный титр рассчитывался по

общепринятой методике. Изучение всех параметров проводилось спустя 24, 48, 72, 96, 120, 144 ч после начала инфекции.

В качестве чувствительной клеточной линии использовалась RD – трансформированная линия рабдомиосаркомы человека. Клетки культивировались в среде Eagle MEM с добавлением 10% бычьей сыворотки. Посевная доза  $1 \times 10^5$  клеток/мл. Монослой получали через 48 ч после начала посева.

В работе использовался вид инфузории *Paramecium aurelia*, взятый из бассейна реки Гетар (Ереван). Опыт проводился по общепринятой методике [9]. Инфузории содержались в стеклянных колбах объемом 200 и 300 мл на солевой среде Лозина-Лозинского [10] с добавлением дрожжевого отвара, по методике полунепрерывного культивирования с ежедневной заменой части среды, при температуре  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Инфузории отмывались в чистой солевой среде и с помощью микропипетки помещались по 10 особей в лунки планшета для культуры тканей с минимальным количеством отмывочной среды. Затем в лунки вносилось по 0.9 мл культуральной среды и 0.1 мл исследуемого вируса в стандартной концентрации. Опыт повторялся 3 раза; усредненные значения полученных результатов представлены в статье.

**Результаты и обсуждение.** Выбор *Paramecium aurelia* – одного из наиболее часто встречаемых представителей Protozoa обусловлен тем, что вирусы могут оказывать существенное влияние на относительную численность различных видов организмов в сообществе. Поскольку вирусы перемещаются пассивно, они чаще заражают клетки с высокой плотностью, поэтому редко встречающийся вид-хозяин менее подвержен инфекции, чем более распространенный.

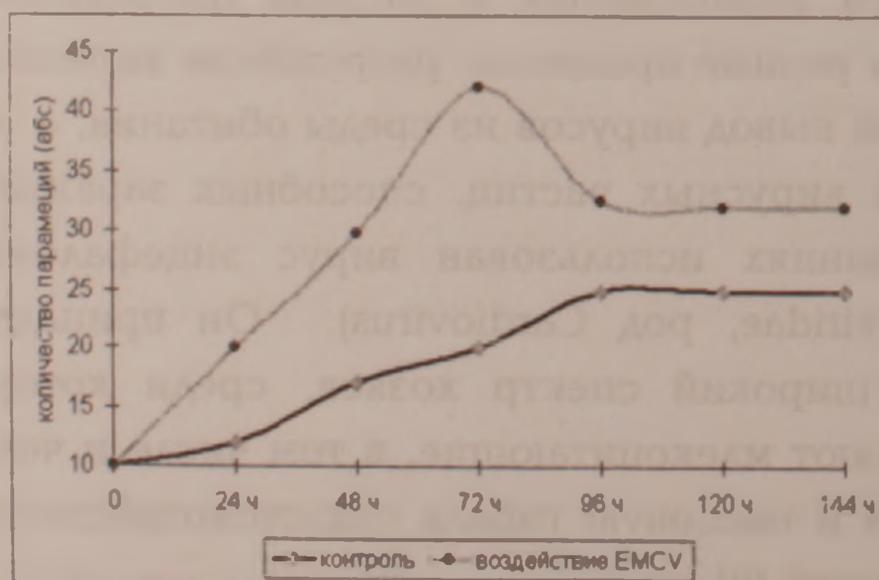


Рис. 1. Изменение численности инфузорий *Paramecium aurelia* при культивировании в среде, содержащей живой вирус.

На рис. 1 изображен рост числа особей *P. aurelia* в чистых культурах на ежедневно сменяемой среде в течение 6 дней. В определенный момент возможность роста культуры инфузорий оказывается исчерпанной и устанавливается некоторое равновесие при непрерывно сохраняемом уровне

пищевых ресурсов. Колебания популяции около этого положения равновесия не закономерны и зависят от разнообразных случайных причин (колебания температуры, небольшая изменчивость в составе синтетической среды и т.п.). Полученные данные указывают, что равновесие наступает примерно спустя 96 ч после начала опыта.

Под действием EMCV происходит резкое увеличение числа инфузорий. Разница с контролем становится достоверной уже спустя 24 ч с начала опыта и достигает максимума спустя 72 ч, когда число инфузорий в опытной группе более чем в два раза превосходит число инфузорий в контроле.

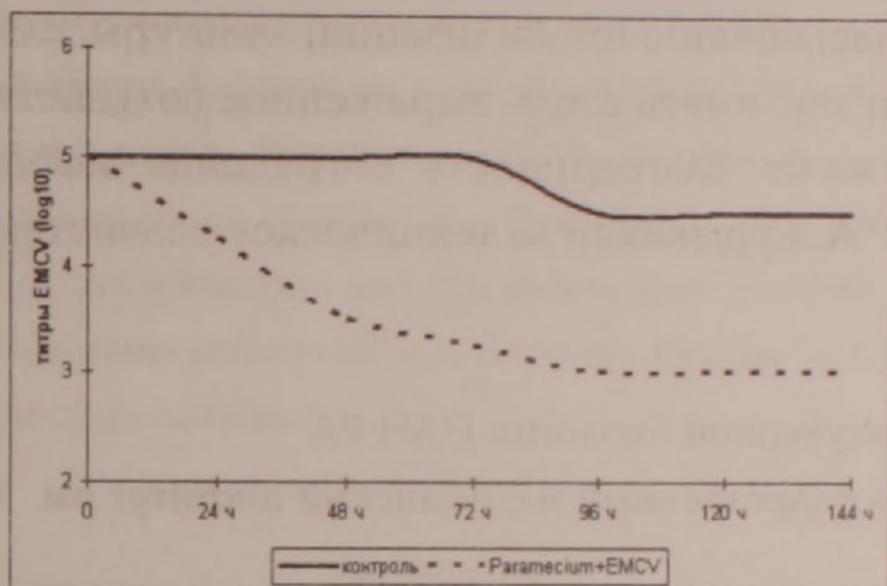


Рис. 2. Снижение инфекционных титров EMCV при сокультивировании с *Paramecium aurelia* и в контрольной среде Лозина-Лозинского.

Как следует из рис. 2, при сокультивировании с инфузорией титр вируса в среде падает со скоростью, намного превышающей контрольные показатели. Если в контроле в течение недели инфекционные титры EMCV снизились на  $0.5 \log_{10}$  (вероятно, одним из главных факторов снижения вирусных титров в контроле является температура среды), то при сокультивировании — примерно на  $1.75 \log_{10}$ , более чем на треть. Снижение титров начинается спустя 24 ч с начала сокультивирования и продолжается в течение 4-х суток. Это свидетельствует о дезактивирующей роли парамеции в отношении вируса.

Известно, что вирусы не способны к активному движению и перемещаются либо с потоками жидкости или газа, либо путем пассивной диффузии. Контакт вируса с клеткой происходит в результате случайной встречи. В связи с этим надо отметить, что инфузории обладают способностью создавать ток жидкости, иногда довольно мощный, который направляется во внутрь клетки, что многократно повышает способность инфузорий к захвату вируса. Скорее всего, важную роль в столь значительном воздействии *Paramecium aurelia* на EMCV сыграло это обстоятельство.

Полученные нами данные указывают на деградацию вируса под воздействием *Paramecium aurelia*. Похожие результаты были получены в опытах с вирусами морских вод, в которых было показано, что бактерии,

протисты и другие организмы могут вызывать деградацию вирусов, иногда с очень высокой скоростью – до 3-10% в час [11]. Вопрос о роли вируса в ускорении пролиферативных показателей инфузорий трудно объяснить. Вероятно, вирус явился дополнительным пищевым источником для *Paramecium aurelia*, что и вызвало весьма резкий рост популяции. О том, что вирусы могут являться дополнительным пищевым источником для инфузорий, свидетельствуют данные об использовании бактериофагов инфузорией *Tetrahymena* в качестве дополнительного пищевого ресурса [12]. С другой стороны, ускорение размножения инфузорий началось в ранние сроки, предшествующие насыщению (стабилизации) культуры, следовательно, пищевой фактор вряд ли мог иметь столь выраженное воздействие.

Авторы выражают благодарность сотруднице кафедры медицинской биологии ЕрГМУ Р. А. Бурджахян за техническое содействие при выполнении работы.

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии НАН РА

<sup>2</sup>Ереванский государственный медицинский институт им. М. Гераци

Г. Е. Восканян, А. Т. Тусузян, Д. Ш. Манучарян, З. А. Каралян

#### Взаимоотношения вируса энцефаломиокардита с *Paramecium aurelia*

Изучены взаимоотношения вируса энцефаломиокардита и инфузории *Paramecium aurelia* в культуре. Продемонстрировано достоверное снижение титров вируса (примерно на 40%) в присутствии инфузорий. Одновременно с этим отмечено резкое возрастание пролиферативной активности *Paramecium aurelia* (более чем вдвое). Снижение вирусных титров может быть результатом фильтрационной способности инфузории с последующей дезактивацией вируса. Одним из факторов, стимулирующих пролиферацию инфузорий, возможно, является использование ими вируса в качестве дополнительного пищевого ресурса.

Ն. Ե. Ոսկանյան, Ա. Տ. Թուսուզյան, Դ. Շ. Մանուչարյան, Ջ. Ա. Կարալյան

#### Էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի եւ *Paramecium aurelia*-ի փոխհարաբերությունը

Ուսումնասիրված է էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի եւ *Paramecium aurelia*-ի փոխազդեցությունը կուլտուրայում: Տույց է փրված, որ ինֆուզորների առկայությունը իջեցնում է վիրուսի փիրը մոտ 40%: Դրա հետ մեկտեղ կարուկ աճում է *Paramecium aurelia*-ի պրոլիֆերափվ

ակտիվությունը (կրկնակի եւ ավելի): Վիրուսի փոքրի նվազումը, հավանականորեն, հետեւանք է ինֆուզորների ֆիլտրացիոն ունակությունների եւ վիրուսի հեքազա դեզակտիվացման: Ինֆուզորների քանակի մեծացումն առաջացնող հնարավոր գործոններից մեկն այն է, որ վիրուսը *Paramecium aurelia*-ի համար սննդի լրացուցիչ աղբյուր է:

H. E. Voskanyan, A. T. Tusuzyan, D. Sh. Manucharyan, Z. A. Karalyan

### Mutual Relations of Encephalomyocarditis Virus with *Paramecium aurelia*

The interference of a encephalomyocarditis virus and *Paramecium aurelia* in culture was investigated. Significant decrease in viral titres (approximately on 40 %) was shown at the presence of the infusorian. Simultaneously the proliferation activity of *Paramecium aurelia* is sharply increased (more than twice). Decrease in viral titres can be the result of the filtration abilities of the infusorian and the subsequent deactivation of a virus. One of the factors causing infusorians proliferation is probably that the virus became an additional food source for *Paramecium aurelia*.

### Литература

1. *Gastrich M. D., Anderson O. R., Benmayor S. S., Cospers E. M.* - *Phycologia*. 1998. V. 37. P. 300-306.
2. *Lawrence J. E., Chan A. M., Suttle C. A.* - *J. Phycol.* 2001. V. 37. P. 216-222.
3. *Schroeder D. C., Oke J., Malin G., Wilson W. H.* - *Arch. Virol.* 2002. V. 147. P. 1685-1698.
4. *Takao Y., Nagasaki K., Mise K., Okuno T., Honda D.* - *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 4516-4522.
5. *Bellarel Y., Amblard C., Sime-Ngando T., Carrias J.-F., Sargos D., Garabetian F., Lavandier P.* - *Microb. Ecol.* 2003. V. 45. P. 119-127.
6. *Blawt F., Kowalska Z.* - *Bull. Inst. Marine Med.* 1963. V. 14. P. 15-24.
7. *Kirkland P. D., Gleeson A. B., Hawkes R. A., Naim H. M., Broughton C. R.* - *Med. J. Aust.* 1989. V. 151. P. 176-177.
8. *Yamada T., Matsumori A., Wang W.Z., Ohashi N., Shiota K., Sasayama S.* - *Heart Vessels*. 1999. V. 14. P. 29-37.
9. *Мамаева Н.В.* Инфузории бассейна р. Волги. Экологический очерк. Л. Наука. 1979. 150 с.
10. *Losina-Losinsky L.K.* - *Arch. Protistenk.* 1931. V. 74. P. 18-20.
11. *Wilhelm S. W., Suttle C. A.* - *BioScience*. 1999. V. 49. P. 781-788.
12. *Hennemuth W., Rhoads L.S., Eichelberger H., Watanabe M., Van Bell K.M., Ke L., Kim H., Nguyen G., Jonas J.D., Veith D., Van Bell C.T.* - *J. Eukaryot Microbiol.* 2008. V. 55. P. 44-50.