

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 576.8

К. О. Овнанян¹, А. Г. Давтян^{1,2}, К. А. Саргсян¹,
член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян²

Наноструктуры некоторых вирусов, клеток бактерий и простейших:
электронная микроскопия и морфометрический анализ

(Представлено 29/III 2010)

Ключевые слова: биологические наноструктуры, вирусы, бактерии и простейшие, электронная микроскопия, лазерная дифрактометрия

В настоящее время в области нанотехнологии, нанобиологии и наномедицины известно много нановеществ и наночастиц, которые по своим физическим, химическим и биологическим свойствам, а также особенностям биобезопасности кардинально отличаются от исходных макромолекулярных образований [1]. Несмотря на интенсивные исследования последних лет в области нанобиологии и наномедицины [2,3], данные об изменениях в различных биологических системах и микробных популяциях [4,5], липосомах [6] и новых вредоносных свойствах наноматериалов и наночастиц [1,2,7], вопросы природы и свойств наночастиц и, в частности, наноструктур вирусов, бактерий и простейших остаются недостаточно изученными. Это диктует новые подходы, связанные с разработкой способов идентификации и анализа наноструктур биологического происхождения, в сравнении с молекулярными и надмолекулярными структурами вирусов, клеток бактерий и эукариот, а также простейших.

Электронномикроскопические исследования вирусов и микроорганизмов в сочетании с современными методами количественного анализа с программным обеспечением дают возможность систематизировать разновидности наноструктур [7,8], играющих важную роль в морфогенезе вирусов и различных клеток.

Представленная работа посвящена ультраструктурному морфометрическому анализу наноструктур некоторых вирусов, клеток бактерий и простейших, которые по своим линейным размерам сопоставимы с наночастицами органической и неорганической природы. В работе приведены данные о наночастицах различной структуры, образующихся в результате воздействия физических, химических и биоорганических факторов на эти объекты.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использованы некоторые ротавирусы, вирусы-симбионты энтамеб, условнопатогенные и патогенные штаммы *Escherichia coli*, *Shigella flexnerii*, спирохеты *Borrelia causasica*, *Treponema pallida*, *Leptospira Pomona*, паразитические и свободноживущие виды простейших: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba moshkovskii* и некоторые простейшие *Leishmania hertigi*, *Lambliа intestinalis*, *Tetrahymena pyriformis*. Из физических и химических факторов использованы γ -ионизирующее излучение и антибиотики с различными спектрами действия.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) объектов проведена с помощью методов негативного контрастирования, криосрезов и ультратонких срезов, описанных ранее [9]. Морфометрический анализ проведен с использованием программного обеспечения "Видео-Тест, 5-Структура, нанотехнология". Лазерная дифрактометрия рибонуклеопротеидных спиралей и хроматоидных телец — рибонуклеопротеидных агрегатов клеток проведена в Институте кристаллографии РАН.

Результаты и обсуждение. *Наноструктуры в вирусах.* Электронномикроскопические исследования позволили обнаружить поверхностные структуры ротавирусов и установить размеры 132 капсомеров двух групп с диаметром около 70 и 4 нм, соответственно (рис. 1,а). Эти результаты сравнимы с идентичными структурами у большинства вирусов [10], в том числе бактериофагов, наблюдаемыми в лизогенных бактериях и в цистах энтамеб [9]. Результаты позволяют считать, что вирусы различных семейств по своим морфометрическим данным (от мелких вирусов диаметром в 20 нм до гигантских диаметром в 500 нм) соответствуют нанообъектам.

Выделены также вирусы-симбионты паразитических и свободноживущих энтамеб *Ent. histolytica* и *Ent. invadens* (рис. 1,б), схожие с рабдовирусами [9]. Эти вирусы расположены в цитоплазме как розеткообразно, так и в контакте с мембранными структурами. Такой контакт нагляден после протистоцидного действия полиенового антибиотика [13], когда видно расположение более 20 частиц вирусов-симбионтов вокруг фагосомальной мембраны аутофагальной вакуоли.

У вирусов-симбионтов энтамеб *Ent. moshkovskii* после действия γ -излучения были выявлены ранее неизвестные структуры в виде электрон-

ноплотных гранул с различным диаметром – от 5 до 35 нм (рис. 1,в). После облучения морфометрические показатели вирусов-симбионтов на ультратонких срезах приравнивались в длине в пределах 160 нм, диаметр – 94 нм, общая площадь – 11036 нм². Наночастицы "О₂" на ультратонких срезах просматривались под оболочкой при выходе из нуклеокапсида, причем диаметр большой гранулы "О₁" составляет 35 нм, площадь – 885 нм², а диаметр маленькой "О₂" – 8 нм, площадь – 45 нм². Выход электронноплотных гранул напоминает апоптический феномен после летального ионизирующего воздействия на эндосимбионты. Гранулы, на наш взгляд, являются вироцидным маркером. Следует заметить, что подобные структуры в виде гранул были предложены для использования в качестве маркера при идентификации энтамеб [9]. Полученные ультраструктурные изменения вирусов-симбионтов связаны с их патологическими проявлениями под воздействием физических и биоактивных факторов, что, на наш взгляд, имеет условный характер.



Рис. 1. а. ПЭМ. Капсомеры ротавируса (негативное контрастирование), масштаб 35 нм; б. ПЭМ. Вирус-симбионт *Ent. histolytica* (негативное контрастирование). Морфометрический анализ с программным обеспечением "Видео-Тест, 5-Структура, нанотехнология"; в. ПЭМ. Вирусы-симбионты *Ent. moshkovskii* после действия γ -излучения. Наночастица "О₁" под оболочкой вируса-симбионта. Ультратонкий срез, масштаб 35 нм.

Наноструктуры в клетках бактерий. Из клеточных структур бактерий для диверсификации могут быть использованы полые трубчатые фимбрии *E. coli* (рис. 2,а), сократительные фибриллы спирохет (диаметр 20-25 нм) и их наноконтакты с базальными гранулами или дисковидными блефоропластами (диаметр 20-40 нм). Для этой же цели ранее были описаны жгутики бактерий [14].

В более поздних стадиях культивирования среди особей *Sh. flexnerii* обнаружены клеточные структуры с диаметром 20-50 нм (рис. 2,б), что по

морфометрическим показателям соответствует нанобактериям [13]. Следует заметить, что подобные тельца были описаны и при действии субтормозящих доз антибиотиков с различными спектрами действия на сальмонеллы [15].



Рис. 2. а. ПЭМ. Фимбрии энтеропатогенного *E. coli* (негативное контрастирование), масштаб 40 нм; б. ПЭМ. Элементарные тельца *Sh. flexnerii*. Ультратонкий срез, масштаб 40 нм.

Наноструктуры в клетках простейших. С помощью электронного микроскопа определены α - и β -типы гликогеновых частиц в цитоплазме вегетативных форм *Ent. histolytica*, в том числе и их гематофагах и цистах. α -гранулы гликогена имеют размеры в диаметре до 200 нм, β -гранулы — до 30 нм. Более того, в цитоплазме изученных энтамеб диффузно расположены гранулы рибосом, полисом, их спиралевидные палочкообразные структуры, которые в зависимости от морфогенеза и режима культивации могут агрегироваться в виде кристаллов, идентичных с хроматидными тельцами (рис. 3,а). Диаметр отдельных рибосом в 18-25 нм соответствует морфометрическим параметрам рибосом эукариотических клеток. Лазерная дифрактометрия отдельных спиралевидных, а также кристаллических агрегатов рибонуклеопротеидных структур показала, что расстояние между центрами спиралей равно 40-42 нм (рис. 3,б).

В зоне уроида установлены также актиновые сократительные микрофиламенты толщиной в 7 нм, выполняющие как сократительные, так и каркасные функции. Последнюю функцию имеют и микротрубочки некоторых простейших (*Leishmania hertigi*, *Lamblia intestinalis*, *Tetrahymena pyriformis*) в виде полых цилиндров с диаметром в 22-25 нм.

В цитоплазме гематофагов *Ent. histolytica* выявлены необычные трубчатые образования с диаметром в 200 нм, с внутренним диаметром в 100 нм и толщиной стенок в 50 нм (рис. 4,а). По строению и содержанию они могут быть причислены к двигательному аппарату простейшего, участвующему в образовании псевдоподии клетки. Кроме того, в изученных видах энтамеб идентифицированы микротрубочки веретена деления с внутриядерной

локализацией и центры их организации – ЦОМТ (рис. 4,б): диаметр таких микротрубочек, которые имеют строение полого цилиндра, равняется 20-25 нм. Просвет микротрубочек имеет ширину около 15 нм, а толщина стенки – 5 нм (рис. 4,б).

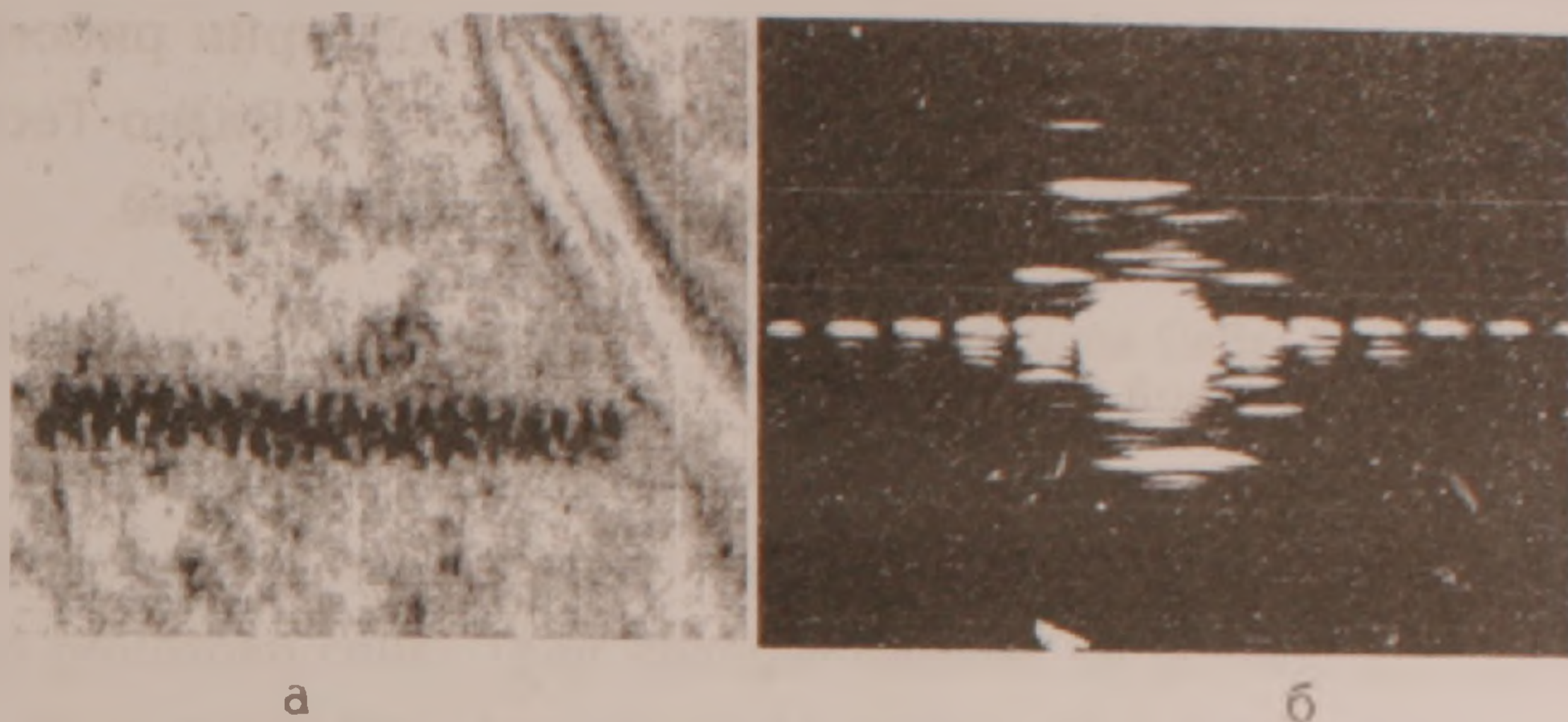


Рис. 3. а. ПЭМ.Спиралевидная рибонуклеопротеидная структура в цитоплазме гематофага *Ent. histolytica*. Ультратонкий срез, масштаб 90 нм; б. Лазерная дифрактометрия спиралевидного рибонуклеопротеидного образования в гематофаге *Ent. histolytica*.

Из внутриядерных наноструктур представляют интерес обнаруженные нами кольцевидные структуры длиной 30-50 нм, по своей тонкой организации напоминающие плазмидные ДНК (рис. 4,в).

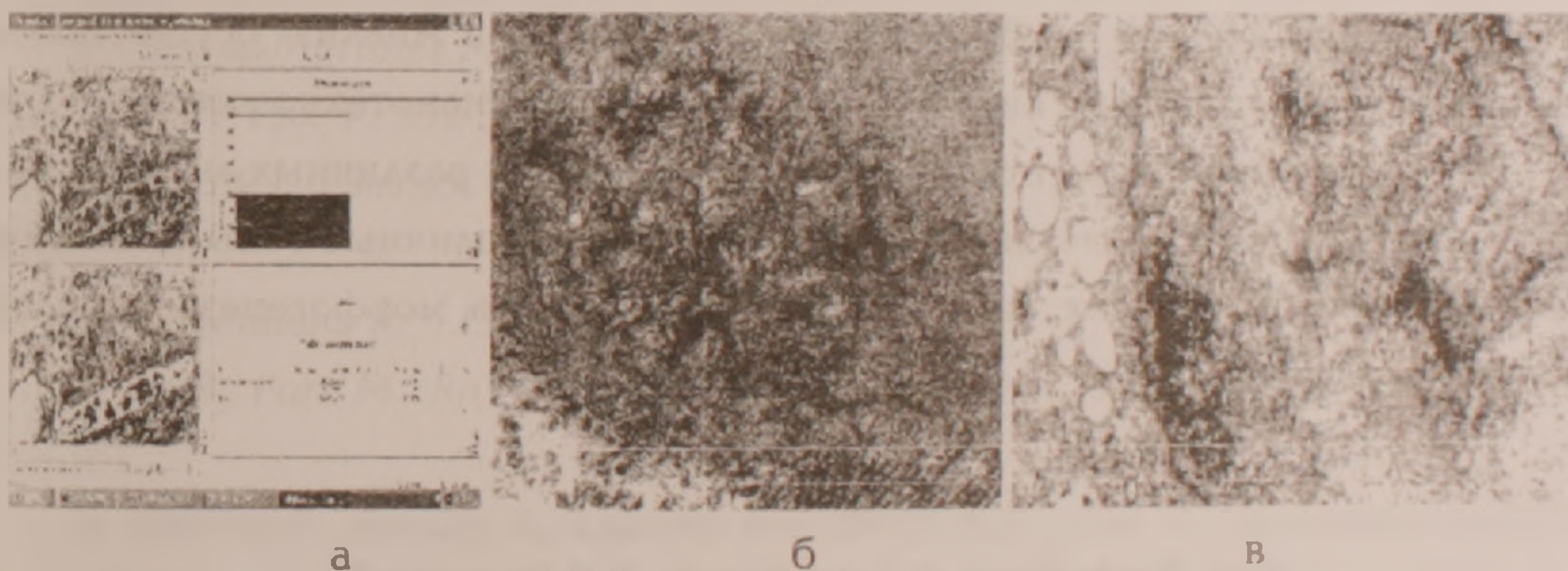


Рис. 4. а. Внутрицитоплазматическая цилиндрическая трубочка: структура гематофага *Ent. hystolytica*. Компьютерный анализ изображений по программе. Ультратонкий срез, масштаб 100 нм; б. Внутриядерные кольцевые структуры ДНК *Ent. hystolytica*. Ультратонкий срез, масштаб 20 нм; в. Внутриядерные микротрубочки веретена и ЦОМТ *Ent. hystolytica*. Ультратонкий срез, масштаб 75 нм.

Таким образом, предпринятый анализ структур наносопоставимых частиц вирусов, клеток бактерий и эукариотических простейших позволил не только их обнаружить, но и в некоторой степени систематизировать и диверсифицировать, что, возможно, будет способствовать индикации ныне

неизвестных патогенов. В таком случае есть необходимость четкой систематизации биологических наноструктур, что позволит использовать их в биологии и медицине при решении различных задач в норме и патологии.

Выражаем благодарность члену-корреспонденту РАН проф. Н.А. Киселеву за содействие в проведении лазерной дифрактометрии рибонуклеопротеидных структур, а также старшему менеджеру ООО "Видео-Тест", Санкт-Петербург, Россия, Н.А.Пряткину за программное обеспечение.

¹Институт молекулярной биологии НАН РА

²Ереванский государственный университет

К. О. Овнанян, Н. Г. Давтян, К. А.Саргсян, член-корреспондент НАН РА А. А. Трчунян

Наноструктуры некоторых вирусов, клеток бактерий и простейших: электронная микроскопия и морфометрический анализ

Проведен электронномикроскопический и морфометрический анализ наноструктур некоторых вирусов, клеток бактерий и простейших. Изучены их изменения при действии физических и биоактивных факторов. Анализ осуществлен с использованием программы "Видео-Тест, 5-Структура, нанотехнология". Такие структуры проявляются после γ -облучения и при действии различных антибиотиков. Полученные результаты позволяют систематизировать различные типы биологических наноструктур, играющих, возможно, важную роль в морфогенезе вирусов и клеток.

Կ.Օ. Նովնանյան, Ն.Գ. Դավթյան, Զ.Ա.Սարգսյան,

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Ա.Ն. Թռչունյան

Որոշ վիրուսների, մանրէների եւ նախակենդանիների բջիջների նանոկառուցվածքները, էլեկտրոնային մանրադիփարկում եւ ձեւաչափական վերլուծություն

Անց է կացվել որոշ վիրուսների, մանրէների եւ նախակենդանիների բջիջների նանոկառուցվածքների էլեկտրոնամանրադիփարկային եւ ձեւաչափական վերլուծություն եւ ուսումնասիրվել են դրանց ֆիզիկական ու կենսաակտիվ գործոնների ներգործությամբ փոփոխությունները: Այդ վերլուծությունը կատարվել է «Վիդեո-թեստ-5-կառուցվածք, նանոտեխնոլոգիա» ծրագրային ապահովմամբ: Այդպիսի կառուցվածքները ի հայտ են գալիս նաեւ γ -ճառագայթման եւ հակաբիոտիկների ազդեցությամբ: Ստացված արդյունքները հնարավորություն

են փալիս դասակարգել փարբեր փեսակի կենսաբանական նանոկառուցվածքները, որոնք, հնարավոր է, կարելի էր են կապարում վիրուսների եւ ուսումնասիրված բջիջների մորֆոլոգիաները:

K. O. Hovnanyan, H. H. Davtyan, Ch. A. Sargsyan,
Corresponding Member of NAS RA A. A. Trchounian

Nanostructures of Some Viruses, Bacterial and Protozoa Cells: Electronic Microscopy and Morphometric Analysis

The electromicroscopic and morphometric analysis of nanostructures of some viruses, bacterial and protozoan cells. Their changes initiated by physical and bio-active factors are studied. The analysis have been carried by "Video-Test-5-Structure, nanotechnology" software. Such structures have been also detected after γ -radiation and antibiotics action. The results obtained permit to differentiate the biological nanostructures of different types and their role in morphogenesis of studied cells.

Литература

1. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. М. Бином. 2008. 184 с.
2. Santos-Martinez M.C., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W. - Br. J. Pharmacol. 2007. V.150. P. 552-558.
3. Suh W.H., Suslick K.S., Stucky G.D., Suh Y.H. - Prog. Neurobiol. 2009. V. 87. P. 133-170.
4. Hugenholtz P. - Genome Biol. 2002. V. 3. P.3.
5. Lu S., Park M., Ro H.S., Lee D.S., Park W., Jeon C.O. - J. Microbiol. 2006. V. 44. P. 155-161.
6. Panwar P., Pandey B., Lakhera P.C., Singh K.P. - Int. J. Nanomedicine 2010. V. 5. P. 101-108.
7. Liang X.J., Chen C., Zhao Y., Jia L., Wang P.C. - Curr. Drug Metab. 2008. V. 9. P. 697-709.
8. Hovnanyan K.O., Trchounian A.A. In Bacterial Membranes. Ultrastructure, Bioelectrochemistry, Bioenergetics and Biophysics (Ed. A.A. Trchounian). Research Signpost, Trivandrum, India. 2009. P. 1-21.
9. Овнанян К.О. - ДНАН Армении. 2008. Т. 108. N 4 С. 356-361.
10. Авакян А.А., Быковский А.Ф. Атлас анатомии и патогенеза вирусов человека и животных. М. Медицина. 1970.. 269 с.
11. Fong C.K., Gross P.A., Hsiung G.D., Swack N.S. - J. Clin. Microbiol. 1975. V. 1. P. 24-32.

12. Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М. Мир. 1982. 456 с.
13. Овнанян К.О., Любимова Л.К., Иванова Л.Н., Сухарева-Немакова Н.Н. Антибиотики, 1987. N 12. С. 903-906.
14. Овнанян К.О., Трчуян А.А. - ДНАН Армении. 2009. Т. 109. N1. С. 78-85.
15. Торджян И.Х., Овнанян К.О., Гукасян Г.Б. - Эксперимент. и клин медицина. 1982. Т. 22. С. 418-421.