

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԲԱՅՐԱՄՅԱՆ ՆԱՆԵ ՎԱԶԵԻ

***PARAMECIUM CAUDATUM* ԻՆՖՈՒԶՈՐԻԱՆԵՐԻ ԴԵՐԸ
ՊԻԿՈՐՆԱՎԻՐՈՒՄՆԵՐԻ ԷԿՈԼՈԳԻԱՅՈՒՄ**

Գ. 00.03 – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2014

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

БАЙРАМЯН НАНЕ ВАЧЕЕВНА

**РОЛЬ ИНФУЗОРИЙ *PARAMECIUM CAUDATUM* В ЭКОЛОГИИ
ПИКОРНАВИРУСОВ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности
03.00.03 - "Молекулярная и клеточная биология"

ЕРЕВАН – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գիտական խորհրդում

Գիտական ղեկավար՝
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր Զ.Ա. Կարայան
կենս. գիտ. դոկտոր Զ.Ռ. Տեր-Պողոսյան
կենս. գիտ. թեկնածու Է.Ա. Առաքելովա
Հայաստանի ազգային ազրարային
համալսարան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. ապրիլի 25-ին, ժամը
14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում,
Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ,
0014, ք.Երևան, Հասարայան փ. 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային
կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և www.molbiol.sci.am կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2014թ. մարտի 25-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար՝ կենս. գիտ. թեկնածու

Գ.Մ.Սկրտչյան

Тема диссертации утверждена в Институте молекулярной биологии НАН РА

Научный руководитель:

доктор биол. наук З.К. Караян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук З. Р. Тер-Погосян
кандидат биол. наук Э.А. Аракелова

Ведущая организация:

Национальный аграрный университет
Армении

Защита диссертации состоится 25 апреля 2014г. в 14⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте
молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной
биологии НАН РА и на сайте www.molbiol.sci.am.

Автореферат разослан 25 марта 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук

Г.М. Мкртчян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Водная среда, как один из основных компонентов нашей биосферы, плохо изучена с точки зрения экологии вирусов. Однако, не являясь естественной средой обитания для патогенных микроорганизмов суши, в том числе и для вирусов, водоемы представляют собой благоприятную среду для сохранения их жизнеспособности [Григорьева Л.В., 1975]. С учетом ряда особенностей вирусов, в частности, отсутствия собственного метаболизма, возникает ряд особенностей, которые необходимо учитывать при исследовании экологии вирусов. Так, вирусы ведут исключительно паразитический образ жизни, используя в своих целях биохимический аппарат клетки-хозяина. Вирионы 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. Для прикрепления к клетке хозяина и проникновения в нее вирусы используют специфические для данной клетки поверхностные белки, часто белки-переносчики. После заражения клетки, вирус начинает размножаться. Теоретически вирусы могут поражать клетки любых организмов. Однако на самом деле круг возможных жертв у каждого вида вирусов строго ограничен: у некоторых вирусов это только один подвид какого-либо организма, у других вирусов – организмы нескольких родственных видов или даже целый род.

Интерес к вирусам, обитающих в пресных водах, возник еще в середине XX века [Терас Ю. Х. и др. 1981], однако немногочисленные работы в данной области были вне интересов к проблемам экологии вирусов. Затем интерес к вирусам, обитающим в биосфере, возник вновь. В ряде работ было показано, что численность вирусов в морской воде в 5–25 раз превышает численность бактерий (обычно концентрация вирусов в эвфотической зоне, т.е. у поверхности, составляет 10 млрд в 1 л воды) [Fuhrman J. A. ,1999; Angly F.E et al., 2006].

Современные исследования выявили, что значительное влияние на численность и распространенность вирусов оказывают экологические условия. Вирусы являются наиболее многочисленным компонентом многих водных биоценозов, которые в подходящих условиях способны размножаться очень быстро. Поскольку вирусы не способны активно искать хозяев, вероятность заражения клеток определяется простыми вероятностными законами. Поэтому, чем многочисленнее те или иные организмы, тем выше вероятность их заражения, из чего следует, что главными жертвами вирусов в водных биоценозах должны быть бактерии и фитопланктон [Яковенко М. Л., 2000]. Отсюда и важность роли вирусов в экологии водных биоценозов, они оказывают существенное влияние на многочисленные биогеохимические процессы в море, эффективно регулируют численность и видовое разнообразие бактерий, фитопланктона, и даже участвуют в формировании глобального климата. Однако изучение вирусов, обитающих в водной среде, только началось и нерешенных проблем в этой области науки еще очень много. По

механизмам передачи и типу взаимоотношения с хозяином все пикорнавирусные инфекции условно можно разделить на две группы. Это инфекции с непрерывной циркуляцией возбудителей, когда передача от одного хозяина к другому происходит перманентно, как, например, в случае энцефаломиокардита и полиомиелита. При этих инфекциях переживание возбудителей во внешней среде если и имеется, то не играет существенной роли в эпидемиологии и жизни вирусной популяции. Или инфекции с прерывистой передачей возбудителей, которые либо выживают в периоды между эпизоотиями и эпидемиями во внешней среде, либо сохраняются благодаря репликации на протяжении длительного времени в одном и том же хозяине. Типичными примерами подобного переживания является длительное сохранение жизнеспособности вируса ящура во внешней среде. Для анализа экологии пикорнавирусов нами исследовались вирусы, которые вызывают оба типа инфекций. Проблема отношений между индивидуумами, популяциями и средой их обитания является одной из основных проблем биологии. Известным способом изучения этих отношений являются экспериментальные исследования. С учетом вышесказанного мы получили и использовали стандартную модель пресноводного биоценоза, состоящего из свободноживущей инфузории (*Paramecium caudatum*) и пикорнавирусов. Помимо этого в водной среде присутствовали компоненты питательной среды для инфузорий – это дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) и бактерии (*Klebsiella pneumoniae*). Пикорнавирусы и компоненты питательной среды для инфузорий находились в индифферентных отношениях. Известно, что парамеции являются универсальными фильтрующими организмами, способными собирать взвешенные частицы из водной среды. О том, что вирусы могут являться дополнительным пищевым источником для инфузорий свидетельствуют данные [Akunyili A. A et al 2008] об использовании бактериофагов инфузорией *Tetrahymena* в качестве дополнительного пищевого ресурса. Вирусы являются источником белков и нуклеиновых кислот, которые могут быть усвоены инфузориями и могут служить дополнительным источником пищевых ресурсов. На современном этапе некоторые впервые выявленные факты (in vitro и in vivo) в экологии вирусов [Соловьев А.В. и др. 2008; Munn C. B., 2006; Sano D. et al., 2006], заставляют по иному подойти к таким понятиям, как узкая специфичность вирусов по отношению к своему хозяину, влияние различных биотических и абиотических факторов на патогенность и инфекционную активность вирусов, механизм появления «новых» вирусов в том числе в «природных лабораториях» - водоемах, участвующих в создании этих «новых» вирусов из аллохтонного или автохтонного материала. Необходимо всесторонне оценить судьбу вирусов, попавших в водоемы с суши, обсудить возможные пути их перемещения и биологической опасности, как для гидробионтов, так и для террабионтов, и особенно, для человека. Высокая экологическая пластичность вирусов обеспечивает возможность их приспособления к новым условиям, включая освоение иной среды обитания, новых хозяев, и может проявиться в адаптации, а в дальнейшем и в возвращении на сушу в

виде морепродуктов и воды, используемой людьми в хозяйственных целях [Степанова О. А., 2010].

Пикорнавирусы являются одними из самых распространенных вирусов, вызывающих заболевания человека и животных. Однако, несмотря на значимость этого явления, вплоть до настоящего времени некоторые аспекты экологии этих вирусов остаются не выясненными. В частности мало изучен вопрос о выживании вируса в водной среде, не исследованы аспекты взаимодействия пикорнавирусов со свободноживущими простейшими пресных вод.

Целью настоящей работы являлось изучение экологии пикорнавирусов в водной среде и их взаимодействие со свободноживущими инфузориями (*Paramecium caudatum*).

В соответствии с поставленной целью были определены следующие основные задачи:

1. Изучить влияние инфузорий на инфекционные характеристики различных пикорнавирусов.
2. Исследовать влияние пикорнавирусов на морфологические, физиологические, цитологические и цитоспектрофотометрические показатели инфузорий.
3. Выявить возможность разрушения пикорнавирусов в пищеварительных вакуолях инфузорий.
4. Выявить роль дериватов пикорнавирусной репликации (дсРНК) в изменении исследуемых показателей у парамеций.

Научная новизна работы:

1. Впервые нами были показаны изменения физиологических показателей *Paramecium caudatum* под влиянием активных пикорнавирусов.
2. Выявлено проникновение пикорнавирусов в тело *Paramecium caudatum* через пищевые вакуоли. С помощью моноклональных антител показано, что капсидные белки пикорнавирусов оказываются неповрежденными в течение всего пищеварительного цикла.
3. Впервые выявлено уменьшение площади тела и количества пищевых вакуолей при кокультивации инфузорий с живыми пикорнавирусами.
4. Выявлены изменения в содержании ДНК и РНК в инфузориях при кокультивировании с различными живыми пикорнавирусами.
5. Впервые показано снижение титров различных пикорнавирусов при кокультивировании в среде с *Paramecium caudatum*.

Практическая ценность. С суши в водоемы заносятся различные вирусы людей, животных, растений и бактерий, которые являются для гидросферы привнесенными из иной экосистемы, т.е. аллохтонными. Основной путь попадания таких вирусов – это занос через сточные воды. Наличие прямых солнечных и ультрафиолетовых лучей, хлоридов, аэробных микроорганизмов, корпускулярных частиц, изменения температуры, рН, жесткости и мутности воды, и многие другие факторы могут, как

содействовать выживанию и сохранению вирусов, так и приводить к их разрушению. Полученные нами данные показывают особенности взаимодействия аллохтонных пикорнавирусов с основными компонентами пресноводного планктона. Особенности выживания аллохтонных пикорнавирусов при кокультивировании с парамециями, позволяют моделировать основные характеристики экологии пикорнавирусов сточных вод.

Апробация работы: Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на международной конференции «Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology» - 4 Ереван 2013, семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (2011-2013).

Научные публикации. Основные материалы диссертационной работы доложены в 6 научных работах, опубликованных, как в местных, так и в международных научных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 107 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы и список литературы-состоящий из 180 источников: Диссертация содержит 9 таблиц, 25 графика и 4 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирусы. Использовались представители семейств пикорнавирусов. Это вирус энцефаломиокардита (EMCV) – штамм (Columbia-SK), живая вакцина полиомиелита (PV-1) штамм Sabin, и вирус ящура (FMDV) типа А, О и Asia (штамм НКР 2007). Для получения острой вирусной инфекции пикорнавирусы использовались в дозе 5.0 ТЦД_{50/мл} на клетку. Титрация проводилась на чувствительных к данному вирусу клеточных культурах на всех сроках исследования в надосадочных пробах, взятых из среды с кокультивируемыми объектами исследования. Вирусный титр рассчитывался по методу Kärber [Finney D. J., 1952]. На модели клеточной линии RD было проведено определение дозы вируса общепринятым методом бляшкообразования под агаровым покрытием. Изучение всех параметров проводилось в сроки 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 часов после заражения инфузорий вирусом.

Клетки. В работе использовались трансформированная перевивная линия рабдомиосаркомы человека (RD), трансформированная клеточная линия карциномы шейки матки человека (HeLa) и трансформированная клеточная линия эмбриональных фибробластов почки хомяка (ВНК-21). Клетки культивировались в среде Eagle MEM, с добавлением 10% бычьей сыворотки. Посевная доза 1×10^5 клеток/мл. Монослой получали через 48 часов после начала пассирования, а затем в среду вводили титруемые вирусы: энцефаломиокардита (EMCV), полиомиелита (PV-1), ящура (FMDV - О, FMDV - А, FMDV - Asia).

В качестве модели простейшего были выбраны инфузории вида *Paramecium caudatum*, взятые из бассейна реки Гетар (Ереван). Инфузории содержались в солевой

среде Лозина-Лозинского с добавлением дрожжевого отвара, по методике полунепрерывного культивирования с ежедневной заменой части среды при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в стеклянных колбах объемом 200 и 300 мл. Инфузории отмывались в чистой солевой среде и с помощью микропипетки по 10 особей помещались в лунки планшета с минимальным количеством отмывочной среды. Затем в лунки вносилось по 0,9 мл культуральной среды и 0,1 мл исследуемого вируса в стандартной концентрации [Мамаева Н.В., 1979]. Помимо живого вируса параллельно в лунки вносилось по 0,9 мл культуральной среды с 0,1 мл инактивированного вируса в стандартной концентрации с целью возможного определения вирусных частиц в качестве пищевого продукта. Для исследования возможного влияния протеолитических ферментов инфузорий на пикорнавирусы, последние одновременно титровались с надосадком из разрушенных трехкратным замораживанием и оттаиванием инфузорий. Для определения влияния инактивированного вируса на пролиферативную активность инфузорий использовался термически инактивированный вирус, который получали путем 60 минутной инкубации вируса при температуре 60°C .

Воздействие температуры и питательной среды инфузорий на инактивацию вируса. Три разных пикорнавируса с инфузориями- *P. caudatum* (10 клеток/мл)-EMCV-CSK (10^5 TCD/ml), *P. caudatum* (10 cells/ml)-FMDV - O (10^5 TCD/ml) и *P. caudatum* (10 cells/ml)-PV-1 (Sabin) (10^5 TCD/ml) инкубировались в среде Лозина-Лозинского, при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Параллельно были подготовлены контрольные группы без инфузорий. Образцы были исследованы через 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 и 216 ч после коинкубации. Инактивация вирусов была проведена при 60°C в течение 75 минут. Дозы инактивированных вирусов были такими же, какие были описаны выше ($5.0 \text{ ТЦД}_{50}/\text{мл}$). Образцы инактивированных вирусов с *P. caudatum* (10 клеток/мл) были исследованы в 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 и 216 ч. Воздействие протеолитических ферментов инфузорий на инактивацию вирусов проводилось с помощью инактивации и разрушения *P. caudatum*, которая делалась три раза процедурой замораживания и размораживания. Количество разрушенных инфузорий было подсчитано с учетом их среднего числа после получения плато в контрольной группе - 35-37 клеток / мл.

Двуспиральная РНК (дсРНК (ларифан)) фагового происхождения была получена из Института микробиологии им. Кирхенштейна Латвийской АН. [Фелдмане Г. Я. и др., 1975]. Двуспиральность была подтверждена высокой температурой денатурации. Доза составляла 10 мкг/мл

Цитоспектрофотометрия: Количественное определение содержания ДНК в ядре и ядрышке Для количественных измерений ДНК и РНК материал фиксировали в 96°C этиловом спирте в течение 30 мин, а затем часть препаратов одновременно окрашивали основным фуксином по Фельгену. [Магакян Ю. А. и Каралова Е. М. 1989], а другие для количественного определения РНК в цитоплазме, ядре и ядрышке инфузопий окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Киферу и Зандриттеру

[Wied L. G, 1966]. Количественное определение ДНК и РНК на окрашенных препаратах производили на цитоспектрофотометре фирмы (Opton) телевизионным методом на максимуме поглощения комплекса ДНК - фуксин (длина волны 575 нм) и РНК – галлоцианин - хромовые квасцы при длине волны 620 нм. Морфологическая окраска инфузорий проводилась с помощью метил зеленого - пиронина [Ромейс, 1953] в модификации Курника [Wied L. G, 1966] на препаратах, фиксированных в 96% этиловом спирте в течение 30'. В результате цитоплазма и ядрышки окрашивались в красно - розовый цвет, а хроматин в зелено - синий или голубой [Darzynkiewicz D., 1994]. Исследование пищевых вакуолей инфузорий проводилось по методу Gray R. (2012).

Для выявления вируса (нами был выбран вирус полиомиелита) использовали меченные FITC антитела (АТ) (для обнаружения вируса использовали моноклональные антитела с FITC против очищенного полиовируса (Affinity BioReagents™, 4620 Technology Drive, Suite 600, Golden, CO 80403 USA, catalog: PA1-73125).

Статистическая обработка. Все эксперименты были повторены шесть раз. Статистические исследования были выполнены с анализом t Студента, при непараметрическом распределении признаков, использовался U-критерий Вилкоксона-Манн-Уитни, корреляцию между изучаемыми показателями проводили при помощи коэффициента корреляции Пирсона – r. Для анализа использовался пакет программ SPSS (17.0 SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование действия EMCV, FMDV и PV-1 на *Paramecium caudatum*.

Изменение титра EMCV, FMDV и PV-1 при коинкубации с инфузориями

Изучалось воздействие инфузорий на инфекционную активность и титр вируса в среде. Как видно из рис. 1 титры EMCV, FMDV и PV-1 при коинкубации с инфузориями на всем протяжении опыта по сравнению с контролем уменьшались. Снижение титра вирусов начиналось уже через 24ч от начала кокультивирования и продолжалось до 9-х суток. Параллельно с этим при увеличении времени коинкубации с *Paramecium caudatum* инфекционная активность всех исследованных вирусов снижалась. При этом инкубация вирусов с разрушенными инфузориями не вызывала изменений в инфекционности вируса по сравнению с контролем (рис. 1). Когда смесь вируса и инфузорий центрифугировалась, и верхний слой анализировался для инвазионной активности, вирусный титр уменьшался параллельно со временем инкубации. Проводили также анализ титра вируса в лизатах инфузорий в динамике. Как видно из полученных нами данных, титры вирусов в среде с разрушенными инфузориями не изменялись в течении всего опыта (таб.1).

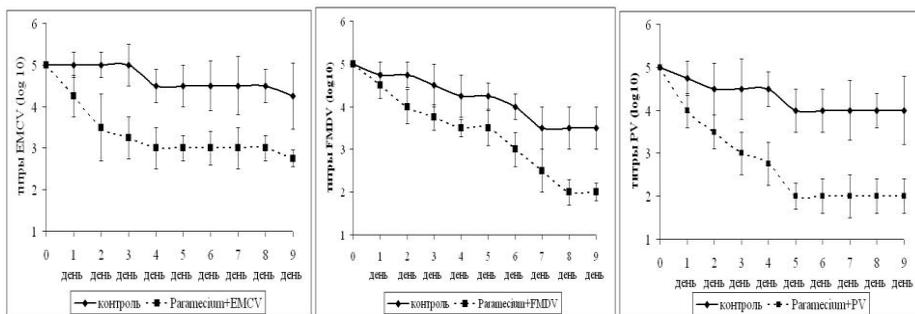


рис. 1 Титры пикорнавирусов во время коинкубации с *Paramecium caudatum* слева на право: EMCV, FMDV – А, PV-1

По оси абсцисс – время коинкубации. По оси ординат - титр вируса \log_{10} .

Разница между титрами вируса в контроле и опыте достоверны начиная с 48 часов. Число инверсии по U-критерию равно 0 ($p < 0,01$).

Исследование влияния протеолитических ферментов инфузорий на инфекционные титры пикорнавирусов не выявило значимых изменений.

Изменение числа *Paramecium caudatum* при воздействии PV-1, EMCV и FMDV

Исследовалась динамика изменений числа инфузорий при их коинкубации в течение девяти суток с активным и инактивным EMCV, FMDV – А и PV-1. Полученные данные приведены на рис. 2, из которых видно, что количество инфузорий при взаимодействии с вирусами достигает более высокого уровня, чем в свободном виде. По сравнению с контролем при внесении в среду EMCV и FMDV, и PV-1 различия достоверны вплоть до 9-х суток инкубации включительно. Так, при EMCV нами получены следующие данные (контроль- $12,0 \pm 1,8$, опыт- $74,6 \pm 15,4$ $t=4,1$, ($p < 0,01$), инактивированный вирус- $33,4 \pm 2,9$ (в контрольной группе- $p < 0,05$, в опыте- $p < 0,01$) на 9-е сутки (контроль- $20,0 \pm 4,3$, опыт- $107,0 \pm 16,3$ ($p < 0,01$), инактивированный вирус- $55,1 \pm 10,2$ (в контрольной группе- $p < 0,05$, с опытом- $p < 0,01$). При воздействии инактивированного вируса число инфузорий по сравнению с контролем повышается недостоверно. При исследовании динамики изменений числа инфузорий при их коинкубации в течение девяти суток с активным и инактивным FMDV (рис. 2) наблюдается аналогичная картина, однако не столь резко выраженная, как при действии вируса полиомиелита. Однако при этом число инфузорий начинает увеличиваться со 2-го дня коинкубации и сохраняется вплоть до 7-го дня инкубации, а затем несколько снижается, но продолжает достоверно отличаться от контроля. К 48 часам количество инфузорий в контроле составляет $10,5 \pm 0,71$, а в опыте $25,3 \pm 4,8$ ($t=3,05$, $p < 0,05$), т.е. различия между опытом и контролем достоверны. дсРНК являются перспективными биологическими модификаторами. Их эффекты, даже при очень

низких концентрациях реализуются, как на молекулярном, так и на клеточном и органном уровнях [Greene J. J. et al, 1984]. ДсРНК и их аналоги часто используются как активаторы метаболических процессов в клетках разных популяций [Земсков В.М. и др., 1985]. По существу неспецифическая дсРНК обеспечивает подавление большого количества генов интерфазной клетки. Влияние неспецифической дсРНК на физиологические показатели инфузорий не исследованы. Для нашей работы использование неспецифической дсРНК явилось важным этапом, в виду того, что в репликационном цикле всех пикорнавирусов обязательно присутствует этап с формированием дсРНК [Fields B. N. et al., 2007]. И использованная нами фаговая дсРНК доза 10мг/мл. На рис.2 также приведены данные по динамике изменений числа инфузорий в процессе культивирования в контроле и при воздействии дсРНК. Нами не выявлены достоверные изменения численности инфузорий при коинкубации с дсРНК, по сравнению с контролем. Исследование цитоспектрофотометрических показателей также не выявило достоверных изменений. Изменение содержания ДНК в макронуклеусе инфузорий может иметь несколько другие механизмы.

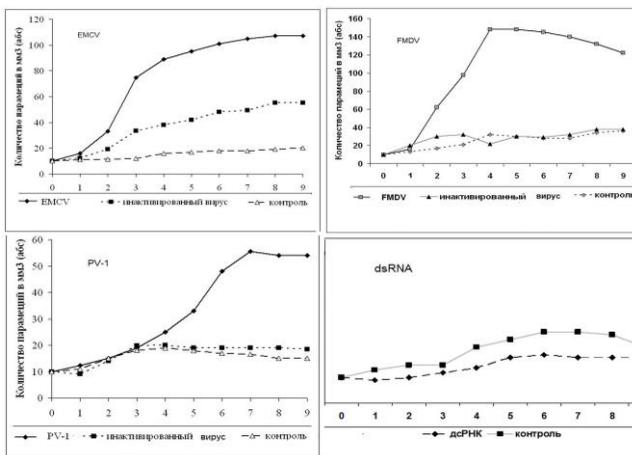


Рис.2 Динамика изменений числа инфузорий при коинкубации с активными и неактивными PV-1, EMCV, FMDV - А. и дс РНК

По оси абсцисс – время коинкубации по дням. По оси ординат – число инфузорий.

Как видно из рисунка 2, в первые трое суток все три вида кривых не отличаются друг от друга. Однако, начиная с четвертых суток, количество инфузорий при действии чистого вируса постепенно увеличивается и к 7 - м суткам достигает пика, а затем до конца опыта держится на одном и том же уровне. Так, к 5 - м суткам коинкубации PV-1 с инфузориями, их число в контрольной группе составило 18.1 ± 2.3 , а в группе испытания было 33.2 ± 6.1 ($t=2.32$, $p < 0.1$). Более того, на 7-е сутки

коинкубации число инфузорий менялось от 17.4 ± 1.9 до 48.1 ± 7.7 ($t=5.83$, $p < 0.005$) соответственно. Такое внезапное увеличение числа инфузорий продолжалось по крайней мере от 2 - х до 4 - х недель. Важно отметить, что во всех опытах при этом, инактивированный вирус не оказывает никакого действия на численность инфузорий и близок к данным контроля, когда в среду с инфузориями ничего не вносилось.

Определение содержания РНК в цитоплазме инфузорий при воздействии EMCV, FMDV - А и PV-1

Как известно, цитоплазма инфузорий, особенно *Paramecium caudatum*, богата РНК [Engberg J, and Pearlman R. E., 1972; Reisner A.H et al, 1979]. На окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами препаратах на цитоспектрофотометре телевизионным методом мы определяли динамику изменений содержания РНК в цитоплазме инфузорий в течение четырех суток культивирования в контроле и при коинкубации с полиовирусом. Опыты показали, что при воздействии вируса происходит изменение количества РНК в цитоплазме инфузорий. Рисунок 3 отображает динамику изменений количества РНК в цитоплазме инфузорий при коинкубации с вирусом энцефаломиокардита, из которого следует, что через 24 часа коинкубации, в цитоплазме достоверно снижается количество РНК ($p < 0.05$), а к 48 часам от начала коинкубации с вирусом энцефаломиокардита сохраняется невыраженная тенденция к снижению, которая к 72 часам сменяется недостоверным повышением ($p < 0.1$) его количества. Данная динамика имеет сходство с динамикой изменений количества РНК при коинкубации с вирусом ящура. Различия наблюдались на четвертые сутки коинкубации, но они недостоверны (рис. 3). В присутствии в инкубационной среде вируса полиомиелита содержание РНК в инфузориях на всем протяжении опыта колеблется в незначительных пределах, однако по сравнению с контролем в течение первых трех суток кокультивирования наблюдается достоверное уменьшение количества РНК в цитоплазме инфузорий ($p < 0.05$), а в дальнейшем к 96 часам сохраняется выраженная тенденция к уменьшению ($p < 0.1$).

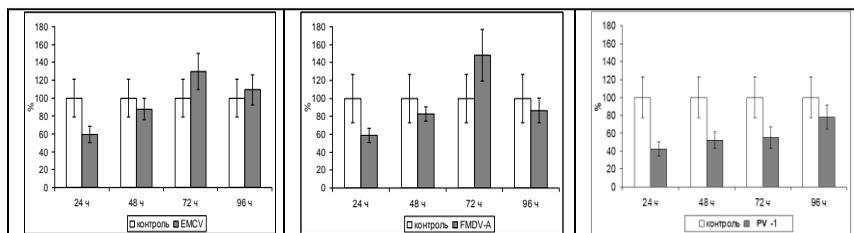


Рис. 3 Изменение содержания РНК в цитоплазме инфузорий при воздействии EMCV, FMDV - А и PV-1.

По оси абсцисс - время коинкубации в час. По оси ординат - содержание РНК в %, (контроль принят за 100%).

Динамика изменений площади *Paramecium caudatum* при кокультивации с EMCV, FMDV - А и PV-1

Как известно, площадь инфузорий состоит в основном, из расположенных продольными рядами ресничек, число которых составляет от 10 до 15 тыс. Оказалось, что в течение четырех суток площадь инфузорий в контроле уменьшается, а, начиная с пятых суток увеличивается, при действии же EMCV площадь инфузорий в первые трое суток увеличивается, а затем падает, достигая уровня первых суток. При этом по сравнению с контролем в течение первых двух суток площадь инфузорий в контроле значительно ниже чем в опыте, но затем она увеличивается и на третьи и четвертые сутки незначительно превосходит их площадь по сравнению с контролем. В дальнейшем. она вновь незначительно уменьшается (табл. 1).

Таб. 1

Динамика изменений площади *Paramecium caudatum* в течение 72 ч коинкубации с PV-1, FMDV - А и EMCV

Группы	24ч	48ч	72ч
Контроль	21937±3851	15286±4025	13137±3057
PV-1	4898 ±1082*	7437±2253*	11147±2362
Контроль	7445±932	15891±2981	10754±3100
FMDV - А	4973±611*	11499±2830**	9696±3277
Контроль.	19942±3021	14506±4021	8576±2367
EMCV	7159±1643*	7920±2864**	12495±5842

*Достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$ - $p < 0,01$)

**тенденция ($p < 0,5$)

При кокультивировании инфузорий с PV-1 их площадь в течение трех суток недостоверно увеличивается, а затем их площадь в контроле и в опыте сравнивается. Но при этом площадь инфузорий на пятые сутки коинкубирования с вирусом значительно превосходит среднюю площадь инфузорий, однодневной культивации. Важно отметить, что при кокультивировании с FMDV - А размеры инфузорий претерпевают значительные изменения. Их размеры на всех сроках исследования ниже, чем в контроле и только к концу опыта приближаются к контролю.

Однако при кокультивировании с PV-1 размеры инфузорий на всех сроках исследования значительно ниже, чем в контроле. Так уже через сутки их площадь по сравнению с контролем уменьшается более, чем в четыре раза, на вторые сутки в два раза, а к третьим суткам на 15%.

Динамика изменений числа пищевых вакуолей *Paramecium caudatum* при воздействии EMCV, FMDV - А и PV-1

Исследовались количественные изменения пищеварительных вакуолей при воздействии всех трех вирусов. В контрольную группу культуры инфузорий и в группу, в которой они культивировались с вирусом, добавляли тушь каждые 24 часа инкубации. Оказалось, что в контрольных группах всех опытов изменения в числе вакуолей были незначительны. Однако при коинкубации с вирусами число вакуолей резко снижалось. Так, при коинкубации с EMCV, (контроль 72 ч $10,8 \pm 8,5$, вирус $3,5 \pm 2,7$; контроль 96 ч $12,0 \pm 5,4$, вирус $1,7 \pm 0,6$ ($p < 0,05$); при коинкубации с FMDV - А, (контроль 48 ч $7,5 \pm 2,9$, вирус $2,4 \pm 1,5$; контроль 72 ч $10,0 \pm 1,9$, вирус $2,8 \pm 0,5$ ($p < 0,05$) и при коинкубации с PV-1 (контроль 48 ч $14,8 \pm 2,3$, вирус $6,1 \pm 1,8$; ($p < 0,05$).

Визуализация белков полиомиелита с помощью флюоресцентных моноклональных антител (АТ)

Для выявления вируса (в качестве исследуемого вируса в данной главе мы выбрали вирус полиомиелита) нами использовались меченные FITC антитела (АТ) (для обнаружения вируса использовали моноклональные антитела с FITC против очищенного полиовируса (Affinity BioReagents™, 4620 Technology Drive, Suite 600, Golden, CO 80403 USA, catalog: PA1-73125). Известно, что принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, которые используют реакцию антиген-антитело, является структурная специфичность исследований. Это значит, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окраска или нет) и его сила (интенсивность окраски), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате (окраска мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов). В работе нами использовались поликлональные АТ к белкам полиовируса. Эти антитела позволяют улавливать все неизменные (в том, числе и протеолитические) белки вируса полиомиелита. Это, в первую очередь, относится к белкам капсида. Капсид полиовируса состоит из 4 белков — VP1, VP2, VP3 и VP4. На поверхности вириона находится в, основном, белок VP1 и в меньшем количестве белки VP2 и VP3. Белок VP4 на поверхности вириона не обнаруживается и находится в тесной ассоциации с вирусной РНК [Fields B. N. et al, 2007]. Уже через сутки после коинкубации флюоресценция отмечается в пищевых вакуолях инфузории (рис. 4 В, С, D). С увеличением времени коинкубации, флюоресценция начинает выявляться по всему телу инфузорий (рис. 4. Е). На более

поздних сроках (рис. 4. F) она заметна и в порошице, и в выделившихся из нее экзоцитозных массах. Вокруг попавших в цитоплазму путем эндоцитоза пищевых частиц образуется пищевая вакуоль. Эти вакуоли перемещаются по эндоплазме к так называемой порошице, через которую непереваренные остатки путем экзоцитоза выводятся наружу.

Пищевая вакуоль не остается на месте своего образования, а попадая в потоки эндоплазмы, проделывает в теле инфузории сложный путь, называемый циклозом пищеварительной вакуоли. По ходу циклоза пищеварительной вакуоли в ней сменяется несколько фаз пищеварения. В результате поступления пищеварительных ферментов из эндоплазмы в вакуоль реакция среды внутри нее становится резко кислой. В этой кислой среде проходят первые фазы пищеварения. Затем картина меняется и реакция внутри пищеварительных вакуолей становится слабощелочной. В этих условиях и протекают дальнейшие этапы внутриклеточного пищеварения. Кислая фаза обычно более короткая, чем щелочная; она длится примерно 1/6—1/4 части всего срока пребывания пищеварительной вакуоли в теле инфузории. Однако соотношение кислой и щелочной фаз может варьировать в довольно широких пределах в зависимости от характера пищи.

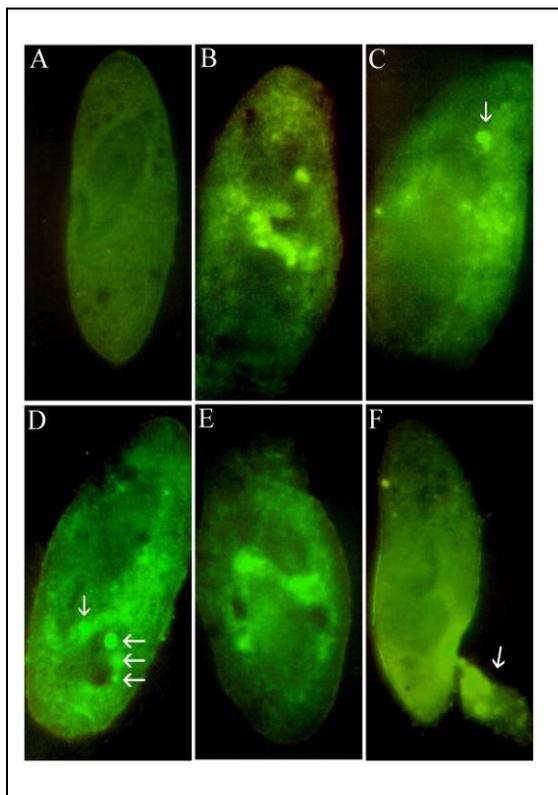


Рис. 4. Визуализация полиовирусных белков, меченных флюоресцентными моноклональными АТ в пищевых вакуолях, в теле и в дефекационных вакуолях инфузории. Ув 400х. **А** – контроль; **В** – 48 часов после коинкубации; **С**– 24 часа после коинкубации (стрелкой указана пищевая вакуоль с прикрепившимися моноклональными АТ); **Д** – 24 часа после коинкубации (стрелками указаны пищевые вакуоли с прикрепившимися моноклональными АТ); **Е** – 72 часа после коинкубации; **Ф** – 72 часа после коинкубации (стрелка указывает на дефекационную вакуоль с выделяющимися из тела инфузории вирусными частицами с прикрепившимися моноклональными АТ).

Хорошо известно, что вирус полиомиелита, как и все остальные энтеровирусы человека, устойчив к кислым значениям рН (2,2—3,0), так как они проникают в организм алиментарным путем, и должны выживать в кислой среде желудка. Однако для вируса полиомиелита характерна устойчивость и в щелочной среде при рН до 10,0 [Жданов В. М. и Гайдамович С. Я., 1966].

Выявленные нами данные показывают, что даже через 48 часов после коинкубации из дефекационных вакуолей (порошицы) выделяются целые вирусные частицы и/или неповрежденные капсидные белки полиовируса, способные присоединять моноклональные АТ (рис. 4. F). Иными словами, если, во время циклоза пищеварительной вакуоли и происходит воздействие внутриклеточного пищеварения на полиовирус, оно не затрагивает белков капсида.

Ядерный аппарат *Paramecium caudatum* в контроле и при коинкубации с EMCV, FMDV - А и PV-1

В инфузориях различают два типа полиплоидии [Райков И. Б., 1967, 1978]. Для полиплоидии первого типа характерна низкая степень пloidности, а для полиплоидии второго типа характерна высокая степень полиплоидизации. Для микронуклеуса (Ми), в основном, характерна полиплоидия первого типа, а для макронуклеуса (Ма) полиплоидия второго типа. По сути, Ми является ядром эукариотической клетки. Он содержит диплоидный, но в ряде случаев, и конкретно у *P. caudatum* - полиплоидный набор относительно мелких хромосом, количество которых может варьировать в пределах одного вида [Raikov I. B., 1982]. Основная функция Ми - хранение наследственной информации и её передача в ходе полового процесса. Ми не обладает транскрипционной активностью. Ядерный аппарат *P. caudatum* обычно состоит из одного Ми и одного Ма. Последний содержит ядрышки, которых нет в Ми [Cameron I. L. et al., 1966; Stevenson I. and Lloyd F. P., 1971]. Форма и размер ядрышек значительно варьирует на различных стадиях клеточного цикла и в разных условиях окружающей среды [Krawchinska et al., 1980]. Известно, что Ми инфузорий часто бывают полиплоидными. Различия в содержании ДНК в Ми инфузорий могут достигать 8-и кратных значений. Однако при этом они укладываются в полиплоидный ряд 1:2:4:6:8 [Хейсин Е.М 1964; Борхсениус О. Н. и Осипов Д. В., 1971]. Мы провели анализ содержания ДНК в исследованных инфузориях и полученные данные по распределению ДНК по классам пloidности в Ми интактной популяции инфузорий приведены на рис. 5. За диплоидный стандарт приняты минимальные значения содержания ДНК в Ми [Chan A.M., 1940]. Анализ количества ДНК и распределение ДНК по классам пloidности в Ми контрольных популяций инфузорий, выявил значения, близкие к таковым в работах Хейсина с соавт (1964) и Blanc (1963). Из рисунка 5, следует, что большинство Ми в исследуемой нами популяции полиплоидны. Количество диплоидных Ми составило менее 10%. Основная масса исследуемых Ми относится к первому типу полиплоидии (4с, 8с, 16с).

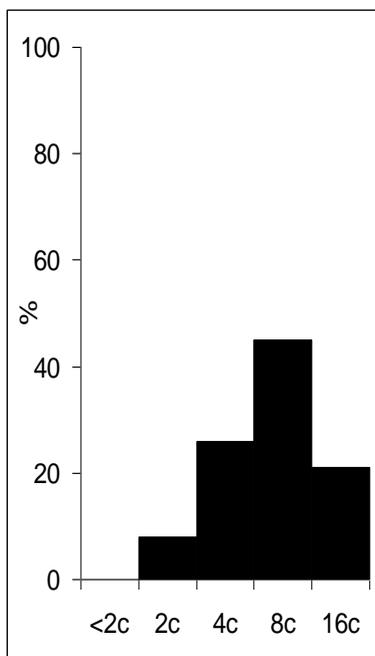


Рис. 5 Распределение ДНК в контрольных Ми инфузорий по классам плоидности.

По оси абсцисс – количество ДНК в ед. плоидности.

По оси ординат – частота встречаемости

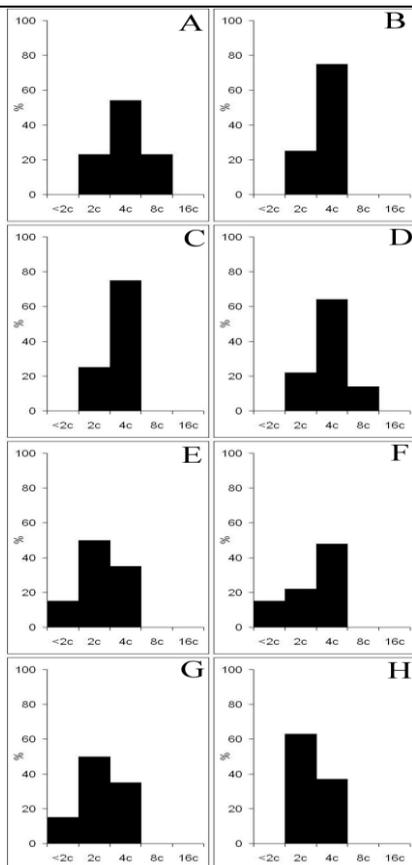


Рис. 6. Динамика распределения Ми инфузорий при кокультивировании с FMDV - А.

По оси абсцисс – распределение микронуклеусов по классам плоидности. А-24ч, В-48ч, С-72ч, D-96ч, E-120ч, F-144ч, G-168ч, H-192ч.

По оси ординат – частота встречаемости

Данные по распределению ДНК в Ми парамеций при кокультивировании с пикорнавирусами представлены на рисунках 6, 7, 8.

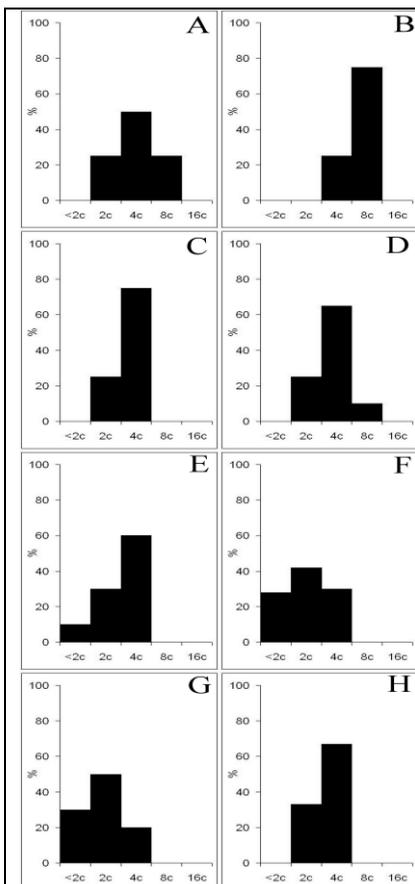


Рис. 7. Динамика распределения Ми в инфузориях при кокультивировании с PV-1.

По оси абсцисс – распределение микронуклеусов по классам плоидности. А-24ч, В-48ч, С 72ч, D-96ч, Е-120ч, F-144ч, G-168ч, Н-192ч.

По оси ординат – частота встречаемости.

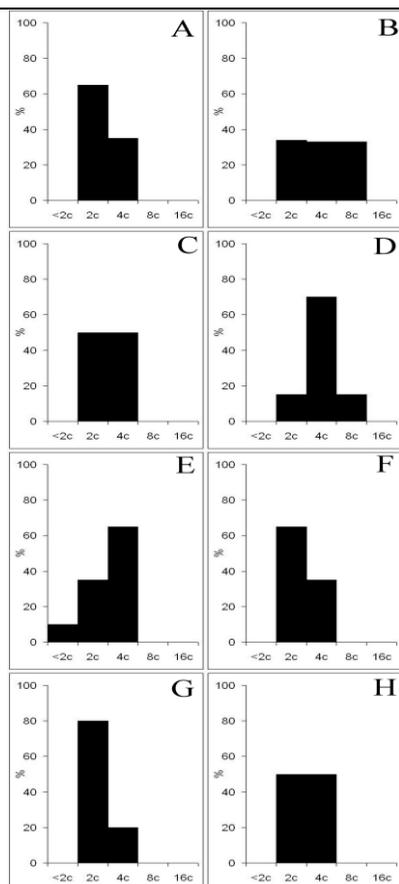


Рис. 8. Динамика распределения Ми в инфузориях при кокультивировании с EMCV.

По оси абсцисс – распределение микронуклеусов по классам плоидности. А-24ч, В-48ч, С 72ч, D-96ч, Е-120ч, F-144ч, G-168ч, Н-192ч.

По оси ординат – частота встречаемости.

Как следует из рисунков 6, 7, 8 по сравнению с контролем нами выявлена тенденция к снижению содержания ДНК в микронуклеусах парамеций при

кокультивации с пикорнавирусами. Данное явление наблюдается как в Ми инфузорий при кокультивации с EMCV, так и с FMDV - А (число инверсий по U-критерию равно 1 при кокультивации с FMDV - А ($p < 0.1$) 0, при кокультивации с EMCV - $p < 0.05$, 0 при кокультивации с PV - 1 - $p < 0.05$).

Макронуклеус (Ма) *Paramecium caudatum*

В отличие от Ми, Ма гиперполиплоиден и к нему нет стандартов. Содержание ДНК в нем колеблется от 30-40 «с» до 190 «с». Как показано [Rasmussen C. D, and Berger J. D., 1982] темпы роста тела инфузорий с одной стороны и скорость синтеза и количество ДНК с другой, пропорциональны начальному содержанию ДНК. Это говорит о том, что темпы роста и синтеза ДНК ограничены транскрипционной активностью Ма, что связано с пролиферативной активностью инфузорий.

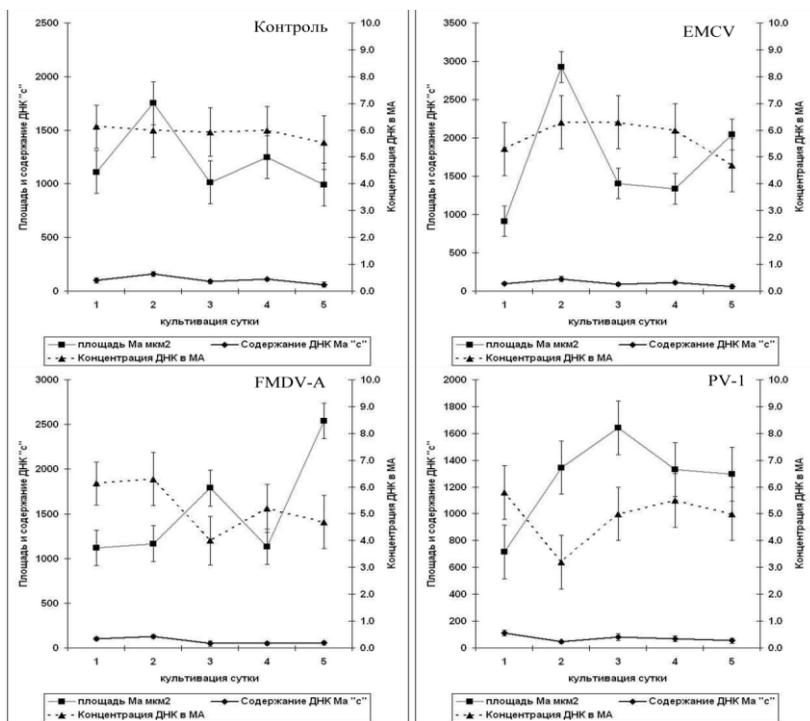


Рис. 9. Изменения площади, содержания и концентрации ДНК в Ма инфузорий в контроле и при коинкубации с вирусами
 По оси абсцисс – время коинкубации по дням. По оси ординат – площадь и содержание ДНК в Ма (слева), концентрация ДНК (справа).

Как следует из рисунка 9, в Ма контрольной популяции инфузорий площадь Ма и содержание ДНК имеют высокую степень корреляции ($r=0.88-0.96$). При коинкубации с вирусами корреляция снижается и становится недостоверной, что свидетельствует о значительных сдвигах в физиологических показателях парамеций.

Соотношение содержания ДНК макронуклеуса к микронуклеусу

Соотношение количества ДНК Ма к Ми имеют прямую зависимость от размеров инфузорий [Райков И. Б., 1978]. Крупные формы всегда имеют большее относительное и чаще всего абсолютное содержание ДНК в Ма. Данный показатель является важным физиологическим индикатором состояния инфузорий. Наши данные выявили, что соотношения Ма/Ми во всех исследуемых группах оставались относительно стабильными и нами не зафиксированы достоверные отличия от контроля и изменялись по сходным закономерностям.

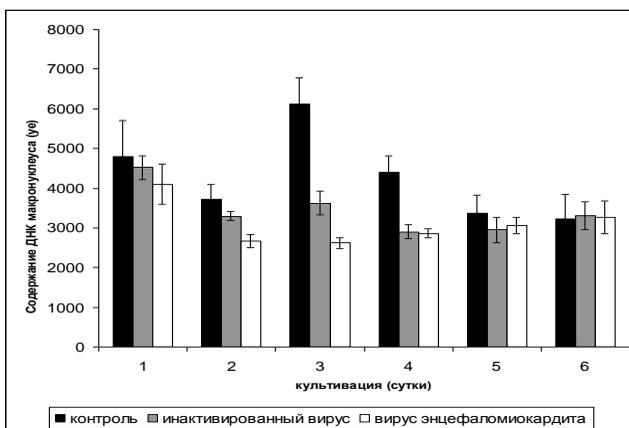


Рис. 10. Динамика содержания ДНК в Ма инфузорий в контроле, и при кокультивации с инактивированным и активным EMCV.

По оси абсцисс – время коинкубации в сутках.

По оси ординат – содержание ДНК в Ма в µg.

Как следует из рисунка 10, нами выявлено достоверное снижение содержания ДНК в Ма инфузорий при кокультивации с активным EMCV по сравнению с контролем. Разница становится достоверной уже ко 2-м суткам после начала кокультивации и сохраняется вплоть до 4-х суток включительно ($p<0.05$). Разница в контроле по сравнению с инактивированным вирусом наблюдается на 3 - 4-е сутки, однако на 2-е и 3-е сутки кокультивация с инактивированным вирусом приводила к

более высоким показателям по сравнению с активным ($p < 0.05$). Также, нами выявлено тенденция к снижению содержания ДНК в Ма инфузорий при кокультивации с активным FMDV - А. по сравнению с контролем ($p < 0.1$), данные этого исследования весьма сходны с данными, полученными при кокультивации с вирусом PV-1. Данная тенденция, как и при полиомиелите, наблюдается лишь на первые сутки после начала кокультивации, и в дальнейшем постепенно исчезает.

Снижение плоидности Ми согласно Райкову (1978) возможно при конъюгации инфузорий с высоким содержанием ДНК в Ми с инфузорией, лишившейся Ми (нами нередко были отмечены подобные инфузории), в некоторых процессах, связанных с половым размножением. Эта часть физиологии одна из наименее изученных в современной биологической науке. Снижение содержания ДНК в инфузориях может быть вызвано и интерференцией РНК (RNAi), как ответ на проникновение вирусных геномов в клетку. Данное явление (элиминация ДНК) в ответ на интерференцию РНК выявлено лишь у цилиат. Подобное явление ранее наблюдали как важный механизм регуляции синтеза мРНК и способ защиты от вирусов [Соколова Т. М. и Ершов Ф. И., 2011]. Явление впервые было описано у транспозирующих элементов. Конечно, пикорнавирусы не могут формировать транспозоны, однако способны формировать характерные нарушения в составе клеточного генома, которые могут приводить к подобному защитному ответу со стороны парамеций.

В норме у инфузорий содержание ДНК подвержено закономерным колебаниям, связанным с прохождением стадий клеточного цикла [Райков Б. И., 1967]. При ингибиции деления парамеций путем облучения ультрафиолетовыми лучами происходит неуклонное увеличение среднего количества ДНК, оно оказывается в 1,8 раза больше, чем у необлученных инфузорий [Самойлова К.А., 1964]. Эта величина, однако не выходит за пределы максимального значения ДНК у необлученных клеток и соответствует содержанию ДНК у тех особей, которые находятся в состоянии, близком к делению. Значительно более резкие изменения наступают в метаболизме РНК: количество ее в цитоплазме облученных клеток снижается с первого дня после облучения, составляя к концу УФ облучения лишь 32% от контроля.

Наши данные показывают сходные изменения, свидетельствующие о том, что коинкубация инфузорий с пикорнавирусами не приводит к изменению основных физиологических показателей за пределы изменчивости вида, однако, говорящие о серьезных изменениях по сравнению с контрольными.

ВЫВОДЫ

1. Исследование экологии пикорнавирусов в системе простейшее - вирус выявило, что при коинкубации вирусов с парамециями происходит достоверное снижение инфекционных титров всех изученных пикорнавирусов (вирус полиомиелита, вирус энцефаломиокардита, вирус ящура). Данное явление наблюдается лишь в присутствии живых инфузорий – лизаты инфузорий не вызывали изменений в титрах пикорнавирусов.
2. Применение моноклональных антител к капсидным вирусным белкам выявило, что начиная с самых ранних стадий исследования вирус активно заглатывается парамециями и содержится в их пищевых вакуолях. Однако, спустя 72-96 часов после начала коинкубации пикорнавирусов с парамециями капсидные белки, выходящие из дефекационных вакуолей, практически не меняются, что позволяет им связываться с моноклональными антителами.
3. При совместном выращивании пикорнавирусов с инфузориями происходит достоверный рост пролиферативной активности *Paramecium caudatum*. Данное явление наблюдается лишь в присутствии активного вируса. Инактивированные пикорнавирусы не вызывали достоверных изменений пролиферативной активности инфузорий. ДсРНК, будучи одним из обязательных этапов репликационного цикла пикорнавирусов не оказывает влияния на пролиферацию инфузорий.
4. Цитофотометрия ядер инфузорий выявила, что коинкубация пикорнавирусов с инфузориями приводит к уменьшению содержания ДНК в макронуклеусе и микронуклеусе *Paramecium caudatum*. Данное явление, вероятно связано с увеличением пролиферационной активности инфузорий и/или особенностей элиминации ДНК у цилиат при явлении интерференции РНК, возникающем во время проникновения пикорнвирусной РНК в клетку.
5. В контрольной популяции *Paramecium caudatum* площадь макронуклеуса и содержание ДНК имеют высокую степень корреляции, а при кокультивации с пикорнавирусами достоверная корреляция отсутствует.
6. Соотношения макронуклеуса к микронуклеуса во всех исследуемых группах остаются относительно стабильными и достоверно не отличаются от контроля.
7. Нами показано изменение физиологических показателей инфузорий при их совместном выращивании с пикорнавирусами, проявляющееся в снижении транскрипционной активности парамеций. Одновременно с этим происходит снижение размеров *Paramecium caudatum*, и уменьшение числа пищевых вакуолей.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Семерджян З. Б., Закарян О. С., **Рамазян Н. В.**, Авагян Г. Р. Воздействие дсРНК на синтез нуклеиновых кислот и маркерного белка в клетках HeLa в условиях in vitro. // Биолог. журн. Армении, 2(62), 2010, 95-99.
2. Каралян З. А., **Рамазян Н. В.**, Восканян Г. Е., Каралова Е. М. Коинкубация фасциолы с вирусом полиомиелита. // Ветеринарна медицина (Feodosia), 2010, 94, 271-273.
3. Karalyan Z.A., Voskanyan H.E., **Ramazyan N.V.**, Zakaryan H.S., Karalova E.M. Interaction of Paramecium caudatum and picornaviruses. // Indian Journal of Virology, 2012, 23(3), 382-386.
4. Восканян Г. Е., Восканян А. Г., **Байрамян Н. В.**, Каралян З. А. Кокультивирование вируса ящура со свободноживущей инфузорией Paramecium caudatum. // Ветеринарна медицина (Feodosia), 2012, 96, 342-344.
5. **Բայրամյան Ն. Վ.** Paramecium caudatum ինֆուզորիայի և էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի փոխհարաբերության ուսումնասիրումը: // Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013, 116-119:
6. **Ваграмян Н.**, Zakaryan H. Interaction of Paramecium caudatum and picornaviruses. // Biolog. Journal of Armenia, Supplement 1(65), 2013, 50-51.

ԲԱՅՐԱՄՅԱՆ ՆԱՆԵ ՎԱՉԵԻ

***PARAMECIUM CAUDATUM* ԻՆՖՈՒԶՈՐԻԱՆԵՐԻ ԴԵՐԸ ՊԵԿՈՒՆԱՎԻՐՈՒՄՆԵՐԻ ԷԿՈԼՈԳԻԱՅՈՒՄ**

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ *Paramecium caudatum*, պիկոռնավիրուս, միկրոնուկլեոս, մակրոնուկլեոս

Վիրուսի էկոլոգիան, հանդիսանալով մանրէաբանության բաժիններից մեկը, մեծ դեր ունի վիրուսների գոյատևման և կենսաշրջանառության օրինաչափությունների, «վիրուս - բջիջ» համակարգում առկա փոխհարաբերությունների ու վարակի տարածման ուղիների բացահայտման մեջ: Կենսալոբոսի հիմնական բաղադրիչներից մեկը՝ ջրային միջավայրը, վատ է ուսումնասիրված վիրուսի էկոլոգիայի տեսանկյունից: Ջրամբարները կարող են բարենպաստ միջավայրեր հանդիսանալ ալոխտոնային վիրուսների համար, որոնք կարող են ներմուծվել ջրային էկոհամակարգ այլ էկոհամակարգերից կոյուղաջրերի և կեղտաջրերի միջոցով:

Պիկոռնավիրուսների ընտանիքին պատկանող վիրուսները համարվում են մարդու և կենդանիների վտանգավոր հիվանդությունների հարուցիչներ, որոնք կարող են առաջացնել այնպիսի վտանգավոր հիվանդություններ, ինչպիսիք են՝ դաբաղը և պոլիոմիելիթը: Այնուամենայնիվ, վիրուսների էկոլոգիան ջրային միջավայրում քիչ է ուսումնասիրված, օրինակ, կան դեռևս չպարզաբանված հարցեր՝ կապված վիրուսների և նախակենդանիների փոխհարաբերությունների հետ:

Աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել բացահայտել *Paramecium caudatum* ինֆուզորիաների և պիկոռնավիրուսների միջև փոխհարաբերությունները, ինչպես նաև ուսումնասիրել պիկոռնավիրուսների էկոլոգիան ջրային միջավայրում:

Աշխատանքում կիրառվել են պիկոռնավիրուսների ընտանիքի երեք ցեղի վիրուսներ (էնտերովիրուսներից՝ պոլիոմիելիթի վիրուսը, աֆտովիրուսներից՝ դաբաղի վիրուսը և կարդիովիրուսներից՝ էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսը): Կատարվել են ինֆուզորիաների ֆիզիոլոգիական ցուցանիշների փոփոխությունների և պոպուլացիոն վերլուծության հետազոտություններ, ինչպես նաև ցիտոսպեկտրոֆոտոմետրիա:

Մեր կողմից ցույց է տրվել, որ պիկոռնավիրուսների ազդեցությամբ բարձրանում է ինֆուզորիաների պրոլիֆերացիոն ակտիվությունը, ինչը պայմանավորված չէ վիրուսներին միայն որպես սնունդ օգտագործելու փաստով, քանի որ ինակտիվացված (ջերմային ինակտիվացում) վիրուսների առկայության դեպքում ինֆուզորիաների պրոլիֆերացիան չի բարձրանում: Ինֆուզորիաների պրոլիֆերացիայի վրա որևէ ազդեցություն չի թողնում նաև պիկոռնավիրուսների պարտադիր ռեպլիկացիոն արգասիք հանդիսացող եպՐՆԹ-ն:

Համաձայն կատարված հետազոտությունների, ինֆուզորիաների հետ կոնինկուբացման դեպքում, նվազում են պիկոռնավիրուսների տիտրերը և այն էլ՝ կոնինկուբացիոն ժամանակին ուղիղ համեմատական: Այս երևույթը բացակայում է ինֆուզորիաների լիզատներում, ինչը ցույց է տալիս, որ ինֆուզորիաների պրոտեոլիտիկ ֆերմենտները չեն հանդիսանում վիրուսների տիտրերի նվազման պատճառ և հնարավոր է, որ ինֆուզորիաներն ինակտիվացնում են վերոնշյալ պիկոռնավիրուսներին:

Պոլիոմիելիթի վիրուսի կապսիդային սպիտակուցների նկատմամբ մոնոկլոնալ հակամարմինների կիրառումը ցույց է տվել, որ վիրուսն ակտիվորեն կլանվում է պարամեցիտների կողմից և պահպանվում վերջիններիս սննդային վակուոլներում: Փորձի արդյունքում պարզվել է, որ կապսիդային սպիտակուցները, որոնք մտնում են արտազատող վակուոլների մեջ, ինֆուզորիաների հետ կոնինկուբացման ավելի ուշ փուլերում գործնականորեն չեն փոխվում, ինչի հիման վրա միանում են մոնոկլոնալ հակամարմիններին: Այս ամենն ապացուցում է, որ պոլիոմիելիթի վիրուսի կապսիդային սպիտակուցները պահպանվում են ինֆուզորիաների սննդային վակուոլներում և դրանցից դուրս են գալիս անվնաս կերպով:

Մեր հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ ինֆուզորիաների միկրոնուկլեոսները ստուգիչ խմբում պոլիպոլիդ են, իսկ վիրուսների հետ կոնինկուբացումից հետո դրանց պոլիպոլիդությունը նվազում է: Պիկոռնավիրուսների ազդեցությամբ ինֆուզորիաների մակրոնուկլեոսներում ստուգիչի համեմատ նվազում է ԴՆԹ-ի քանակը: Տվյալ փաստը կարող է կապված լինել ինֆուզորիաների պոլիֆերացիոն ակտիվության բարձրացման կամ ԴՆԹ-ի էլիմինացիայի հետ, որն առաջանում է թաթթվավորների մոտ բջջի մեջ պիկոռնավիրուսային ՌՆԹ-ի ներթափանցման ժամանակ ՌՆԹ-ինտերֆերենցիայի դեպքում՝ որպես պաշտպանական մեխանիզմ:

Պիկոռնավիրուսների ազդեցությամբ ինֆուզորիաների մոտ իջնում է նաև տրանսկրիպցիոն ակտիվությունը, որը դրսևորվում է ցիտոպլազմայում ՌՆԹ-ի քանակի հավաստի նվազմամբ: Այս ամենն իր հետ բերում է նաև ինֆուզորիաների սննդային վակուոլների քանակի նվազում և արտաքին մակերեսի փոքրացում:

Փորձերի ընթացքում ցույց է տրվել, որ ինֆուզորիաների ու պիկոռնավիրուսների ընդհանուր կոնինկուբացման ընթացքում նվազում է սննդային վակուոլների քանակը, ինչպես նաև ինֆուզորիաների՝ վերը նշված ֆիզիոլոգիական ցուցանիշների փոփոխությունների կապը ինֆուզորիաների պոլիֆերացիոն ակտիվության բարձրացման հետ:

Հիմնարար տեսանկյունից կատարված աշխատանքի արդյունքները զգալիորեն հարստացնում են վիրուսների տարածման նոր ուղիների մասին առկա պատկերացումները: Ստացված տվյալները կարող են կիրառություն գտնել նաև համաճարակաբանության ոլորտում:

THE ROLE OF *PARAMECIUM CAUDATUM* IN THE ECOLOGY OF PICORNAVIRUSES

SUMMARY

Key words: *Paramecium caudatum*, picornavirus, macronucleus, micronucleus

Being a part of microbiology, virus ecology plays an important role in the discovery of survival and circulation of the viruses as well as in finding out the interrelations in the cell-virus system and the ways of the spread of the infection. The water environment, one of the main components of the biosphere, is explored poorly from the point of view of virus ecology. The reservoir storages can be favorable environments for the alochtonic viruses, which can penetrate to the water environment from the other ecological environments such as waste water. The viruses of the picornaviruses family are considered as causative agents of many dangerous diseases of animals and humans such as foot-and-mouth disease virus (FMDV) and poliomyelitis. However, the virus ecology in the water environment is studied poorly and the interrelations between the viruses and protozoa are not clarified yet.

The aim of the study was to discover the interrelations between the picornaviruses and *Paramecium caudatum* infusorians and also investigate the ecology of the picornaviruses in the water environment.

In the study three members of the picornaviruses family (the poliomyelitis from the subfamily of enteroviruses, the FMDV from the subfamily of aftoviruses, and the EMC from the subfamily of cardioviruses) were used. The changes in physiological parameters and population analyses as well as cytophotometry of infusorians were studied.

We have shown that the influence of the picornaviruses results in increase in the proliferation activity of the infusorians which can't be explained due to the presence of dsRNA because there is no increase in the infusorians proliferation in the presence of the inactivated viruses (thermal inactivation). Also, the main product of the activation, dsRNA, didn't effect the proliferation of the infusorians.

According to the studies performed, the picornovirus titres were decreased in the case of coincubation with the infusorians and the longer the duration of the incubation, the significant is decrease. In the lysate of the infusorians this effect is absent which suggested

that the proteolytic enzymes aren't the causes of the decrease of the virus titres and it is possible that the infusorians inactivated the above mentioned picornaviruses.

The use of the monoclonal antibodies against the capsid proteins of the poliomyelitis virus show that the virus is actively penetrated by the parameciums and is kept in their food vacuoles. During the experiments it has been shown that the capsid proteins which penetrate into the defecational vacuole during the incubation with the infusorians, undergo practically no changes in the late stages and bind with the monoclonal antibodies. All of this suggested that the proteins of the capsid of the poliomyelitis virus are kept in the food vacuoles of the infusorians and left it safety.

Our studies showed that the micronucleosomes of the infusorians are polyploidic in the control group while after the coinubation with the viruses their polyploidation decreases. In the macronucleosomes of the infusorians compared with the control group the amount of DNA is decreased. This can be explained due to the increased proliferation activity of the infusorians or the DNA elimination. The DNA elimination appears during the penetration of the RNA of the picornaviruses into the cells as a protective mechanism. The transcriptional activity of the infusorians also decreased because of the influence of the picornaviruses demonstrated as a significant decrease in the RNA amount in the cytoplasm. These data results in the decrease of the number of the food vacuoles and exterior surface.

During our experiments it was demonstrated that the amount of the food vacuoles is decreased during the incubation of the infusorians with the picornaviruses and also that the changes of the physiological parameters of the infusorians are related to the increase of its proliferation activity.

From the fundamental point of view, the results of the present study significantly enrich the current knowledge on the new ways of the spread the viruses. These data also can be applied in the field of epidemiology.