Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

• *Փորձարարական և տեսական հոդվածներ* •*Экспериментальные и теоретические статьи*•
•*Experimental and theoretical articles*•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(65), 2013

PARAMECIUM CAUDATUM ԻՆՖՈՒԶՈՐԻԱՅԻ ԵՎ ԷՆՑԵՖԱԼՈՄԻՈԿԱՐԴԻՏԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ՓՈԽՀԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Ն.Վ. ԲԱՅՐԱՄՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ
Բջջային կենսաբանության լաբորատորիա
naneramaz@mail.ru

Էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի և *Paramecium caudatum* ինֆուզորիաների կոինկուբացման ուսումնասիրության ժամանակ հայտնաբերվել է ինֆուզորիաների քանակի հավաստի ավելացում կենդանի վիրուսի առկայության պայմաններում: Պարամեցիումի քանակական աճը էն-ցեֆալոմիոկարդիտի վիրուսի առկայությամբ հնարավոր չէ բացատրել միայն նրանով, որ վիրուսը ինֆուզորիաների համար սննդի աղբյուր է ծառայում: Դրա մասին է վկայում, սննդային միջավայր ինակտիվ վիրուսներ ներմուծելու ժամանակ ինֆուզորիաների քանակի աննշան ավելացումը:

Ինֆուզորիաների քանակի աճմանը զուգահեռ տեղի է ունենում վիրուսի տիտրի նվազում, որը կենդանի ինֆուզորիայի հետ կոինկուբացման դեպքում կապված չէ վերջինիս պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների հետ, քանի որ, ինֆուզորիաների լիզատները ազդեցություն չեն ցուցաբերում վիրուսի տիտրի վրա:

Paramecium caudatum – էնցեֆալոմիոկարդիտի վիրուս

При исследовании коинкубации вируса энцефаломиокардита с инфузорией *Paramecium caudatum* выявлено достоверное увеличение численности инфузорий в присутствии живого вируса. Рост численности парамеций в присутствии вируса энцефаломиокардита невозможно объяснить только тем, что последний служит лишь источником пищи для инфузорий. Об этом свидетельствует незначительное возрастание численности инфузорий при внесении в среду инактивированных вирусов.

Одновременно с ростом численности инфузорий происходит снижение титров вируса, которое при инкубации с живыми инфузориями не связано с протеолитическими ферментами инфузорий, так как лизаты последних не оказывали влияния на инфекционные титры вируса.

Paramecium caudatum – вирус энцефаломиокардита

The quantity of infusorias increased during the coincubation of Encephalomyocarditis virusº with infusoria *Paramecium caudatum*. This phenomenon is not a result of the explanation in accordance with *Paramecium* is food source for infusorias. This is supported by that fact that quantity of infusorias increased when we add the same amount of inactivated virus into the medium.

Along with the increasing number of infusoria the viral titers was reduced. This decrease is not associated with proteolytical effect of infusoria's enzymes, because infusorias lysates do not influence on infectious virus titers.

Paramecium caudatum – Encephalomyocarditis virus

Վիրուսներն, ինչպես նաև այլ միկրոօրգանիզմներ, կարող են սիմբիոզի մեջ մտնել տարբեր նախակենդանիների հետ՝ ստեղծելով նախակենդանիվիրուս համակարգ, որը կարող է ունենալ մեծ դեր վիրուսի էկոլոգիայի տեսանկյունից [5, 9, 11, 12]:

Այդ համակարգում մի կողմից նախակենդանիները կարող են հանդիսանալ տեր կամ

շտեմարան վիրուսների համար, մյուս կողմից՝ վերջիններս կարող են ինակտիվացվել նախակենդանիների կողմից [2, 3]: Այդ համակարգում առավելապես հետաքրքիր են վիրուս – նախակենդանիներ փոխհարաբերությունները, քանի որ ինֆուզորիաները պատկանում են ամենատարածված նախակենդանիների շարքին:

ԷՄԿ պիկոռնավիրուսը համարվում է մարդու և կենդանիների վտանգավոր հիվանդությունների հարուցիչ [7]: Այն կարող է առաջացնել համաճարակ և գյուղատնտեսական կենդանիների զանգվածային մահածության պատճառ հանդիսանալ [14]: Աշխատանքի նպատակն է եղել պիկոռնավիրուսի էկոլոգիայի ուսումնասիրումը և դրա կենսաշրջանառությունը նախակենդանի վիրուս համակարգում:

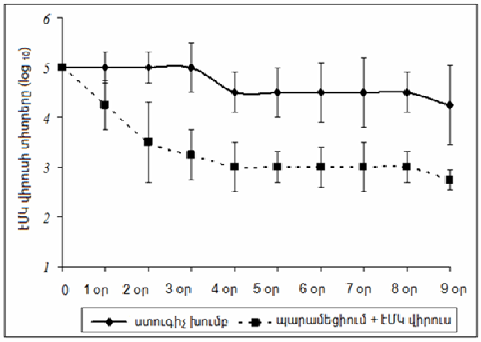
Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքում օգտագործվել են *Paramecium caudatum* ինֆուզորիաներ, որոնք աճեցվել են 22 ^{0}C-ում Losina-Losinsky միջավայրում (աղային լուծույթ) [10]: Փորձերի համար ինֆուզորիաները ինկուբացվել են վիրուսի հետ 22^{0}C-ում նույն *Losina-Losinsky* միջավայրում: Զուգահեռ ստեղծվել է նաև ինֆուզորիաներից զատ (միայն վիրուսով) ստուգիչ խումբ: Ինֆուզորիաների ինակտիվացումը և քայքայումը կատարվել է երեք անգամ՝ վերջիններիս սառեցման/ապասառեցման եղանակով:

Աշխատանքում օգտագործվել է ԷՄԿ վիրուսի Columbia-SK շտամը: ինֆուզորիաներով Losina-Losinksy միջավայր ներմուծվել է 5,0 log TCD 50/մլ չափաբաժնով վիրուս: Ինֆուզորիա-ԷՄԿ վիրուսը կոինկուբացվել է 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 ժ: Յուրաքանչյուր ժամվա (24 ժ) ինֆուզորիա-ԷՄԿ վիրուս կուլտիվացված միջավայրից վերցվել են փորձանմուշներ և տիտրվել RD (մարդու ռաբդոսարկոմայի տրանսֆորմացված բջիջներ) բջջային կուլտուրայի վրա: Վիրուսի տիտրը որոշվել է KՊrber-ի մեթոդով [4]: Վիրուսի ինակտիվացումը կատարվել է ջերմային եղանակով՝ միջավայրի ջերմությունը 60 ^{0}C, տևողությունը 50 րոպե: Ի սկզբանե, ինակտիվացված վիրուսի չափաբաժինը եղել է նույնը, ինչ որ փորձարարական խմբում: Նույնն է եղել նաև *P. caudatum* ինֆուզորիաների և ինակտիվացված վիրուսի ինկուբացման ժամանակը:

Աշխատանքում օգտագործվել է RD բջջային կուլտուրա, որն աճեցվել է Eagle MEM միջավայրում՝ ավելացրած խոշոր եղջերավոր կենդանու 10%-անոց շիճուկ: Փորձերն կատարվել են 36-36.5՛C ջերմաստիճանում:

Բոլոր ուսումնասիրությունները կատարվել են վեց չափանիշի կրկնությամբ: Վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է ըստ Ստյուդենտի:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրվել է սննդային միջավայրում կենդանի ինֆուզորիաների ազդեցությունը վիրուսի տիտրի և վարակի ակտիվության վրա: Ինչպես երևում է նկ. 1-ից՝ ինֆուզորիաների հետ կոինկուբացիայի ընթացքում վիրուսի տիտրը նվազում է ստուգիչ խմբի հետ համեմատած: ԷՄԿ վիրուսի տիտրի նվազումը սկսվում է կուլտիվացումից 24 ժ հետո և տևում է 4 օր, կուլտիվացման 6-րդ օրը հասնում է՝ 4-4.7 log TCD 50/մլ, իսկ 9-րդ օրվա կուլտիվացման ընթացքում ԷՄԿ վիրուսի տիտրը իջնում է 4,25 log TCD 50/մլ: Պարամեցիումի հետ կոինկուբացման ժամանակի ավելացմանը զուգահեռ՝ վերը նշված պիկոռնավիրուսի վարակի ակտիվությունը նվազում է:



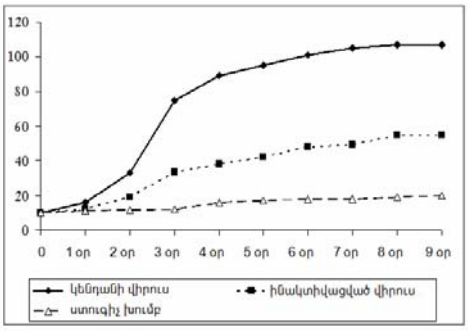
Նկ.1. ԷՄԿ վիրուսի տիտրի նվազումը *P. caudatum* ինֆուզորիաների հետ կոինկուբացման ընթացքում

Կատարվել է *P.caudatum* ինֆուղորիաներիի լիզատներում ԷՄԿ վիրուսի տիտրի դինամիկայի վերլուծություն: Համաձայն մեր ստացված տվյալների՝ ԷՄԿ վիրուսի տիտրերը քայքայված ինֆուզորիաներով միջավայրում չի փոխվել դիտարկման ամբողջ ժամանակահատվածում:

Աղ.1. Էնցեֆալոմիոկարդիտ վիրուսի տիտրի դինամիկան *P. caudatum* ինֆուզորիաների լիզատներում

Կոինկուբացման օրերը	ԷՄԿ վիրուս ստուգիչ խումբ	ԷՄԿ-ի վիրուսի կոինկուբացումը քայքայված *P. caudatum*-ի հետ
0	5	5
1	5	5
2	5	5
3	5	5
4	4,5	4,5
5	4,5	4,5
6	4,5	4,5
7	4,5	4,25
8	4,5	4,25
9	4,25	4,25

Ուսումնասիրվել է *P.caudatum*-ի քանակական փոփոխությունը ակտիվ և ինակտիվ ԷՄԿ վիրուսի կոինկուբացման ընթացքում: Ստացված արդյունքները ամփոփված են նկ. 2-ում:



Նկ.2. *P. caudatum* ինֆուզորիաների քանակական փոփոխությունը ԷՄԿ վիրուսի հետ կոինկուբացման ընթացքում

Ինչպես երևում է նկ. 2-ից՝ ինֆուզորիաները ԷՄԿ վիրուսի փոխազդեցության պայմաններում հասնում են աճման ավելի բարձր մակարդակի, քան առանձին պայմաններում: Դրանց քանակը ստուգիչ խմբի հետ համեմատած տալիս է զգալի տարբերություն սկսած ինկուբացման 3-րդ օրից (ստուգիչ խումբ՝ 12.0°1.8, փորձարարական խումբ՝ 74.6°15.4 t=4.10, ($p<0.01$), ինակտիվացված վիրուսով՝ 33,4°2,9 (ստուգիչ խմբի հետ $p<0,05$, փորձարարական խմբի հետ $p<0,01$) մինչև 5-րդ օրը և պահպանվում է մինչև 9-րդ օրը (ստուգիչ խումբ՝ 20,0°4,3, փորձարարական խումբ՝ 107,0°16,3 ($p<0,01$), ինակտիվացված վիրուսով՝ 55,1°10,2 (ստուգիչ խմբի հետ $p<0,05$, փորձարարական խմբի հետ $p<0,01$): Ինակտիվ վիրուսի ազդեցությամբ ինֆուզորիաների քանակը քիչ է ավելանում ստուգիչ խմբի ինֆուզորիաների քանակի համեմատ:

Նախակենդանիների օրգանիզմում պիկոռնավիրուսների պահպանման հնարավորությունների մասին ապացույցները հաստատված են որոշ աշխատանքներում [8, 13], -սակայն պիկոռնավիրուսների և թարթիչավորների միջև փոխհարաբերությունների առանձնահատկությունները դեռևս պարզաբանված չեն: Մի շարք գիտական- ներ առաջարկեցին *Tetrahimena pyriformis* ինֆուզորիայի և պոլիոմելիթի միջև փոխհարաբերության չեզոք ձև, սակայն հետագայում ցույց տրվեց, որ պոլիոմիելիթը կարող է բազմանալ *T.pyriformis*-ի մեջ [8]: Բացի այդ գոյություն ունեն շատ հակասական փաստեր: Այսպես, որոշ բակտերիոֆագեր, ինչպիսիք են՝ PhiX174 և MS2 կայուն են *T. pyriformis*-ի կողմից ինակտիվացմանը [1]: Սակայն ցույց է տրվել, որ T4 բակտերիոֆագը ինակտիվացվում է նույն ինֆուզորիայի կողմից [6]: Գրականության մեջ Էնցեֆալոմիոկարդիտ վիրուսի և *P. caudatum*-ի փոխհարաբերությունների վերաբերյալ տվյալներ գրեթե չկան: Էնցեֆալոմիոկարդիտի և ինֆուզորիայի միջև եղած փոխհարաբերությունը նկարագրված է *T. pyriformis* ինֆուզորիայի օրինակով [8]:

Այսպիսով, ստացված տվյալները ցույց են տալիս, որ կենդանի ինֆուզորիաներով միջավայրում ԷՄԿ վիրուսի ինակտիվացումը կատարվում է ավելի արագ, քան ինֆուզորիայի լիզատների փոխազդեցության պայմաններում (նկ.1, աղ. 1): Սա ապացուցում է, որ վերջիններս միմյանց հետ մտնում են որոշ փոխազդեցության մեջ: Կատարված փորձերից կարելի է ենթադրել, որ ինֆուզորիաները ինակտիվացնում են ԷՄԿ վիրուսը այն միջավայրում, որտեղ տեղի է ունեցել կոինկուբացումը: Վիրուսի ինակտիվացումը պայմանավորված չէ ինֆուզորիաների պրոտեոլիտիկ ֆերմենտներիի ազդեցությամբ, քանի որ էնցեֆալոմիոկարդիտի և քայքայված ինֆուզորիաների համատեղ կոինկուբացման պայմաններում չեն առաջանում վիրուսի տիտրի էական տարբերություններ: Պարզվել, որ կենդանի ինֆուզորիայի և վիրուսի կոինկուբացման ընթացքում, որ վիրուսային տիտրերի նվազմանը զուգընթաց ավելանում է ինֆուզորիաների քանակը: Այս երևույթը պայմանավորված չէ միայն վիրուսին՝ որպես սննդային աղբյուր օգտագործելու փաստով, քանի որ համաձայն մեր տվյալների՝ ինակտիվ վիրուսներ ներմուծելով սննդային միջավայր ինֆուզորիաների քանակը շատ քիչ է ավելանում ստուգիչ խմբի համեմատ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Akunyili A.A., Alfatlawi M., Upadhyaya B., Rhoads L.S., Eichelberger H, Van Bell C.T.* Ingestion without inactivation of bacteriophages by Tetrahymena. J. Eukaryot. Microbiol., *55*, 3, 207-213, 2008.
2. *Bettarel Y., Amblard C., Sime-Ngando T., Carrias J.-F., Sargos D., Garabetian F. & Lavandier P.* Viral lysis, flagellate grazing potential and bacterial production in Lake Pavin: a short-term study. Microbial Ecology, *45*, 119-127, 2003.
3. *Blawat F., Kowalska Z.* Investigations *in vitro* on the influence of some amoeba on survival of poliomyelitis virus . Bull. Inst. Marine Med. In Gdansk. *14*, p. 15-24, 1963.
4. *Finney J.* Statistical Method in Biological Assay. Hafner Publishing Co., N.Y.
5. Gastrich M.D., Anderson O.R., Sh.S. Benmayor, and E.M. Cosper Ultrastructural analysis of viral infection in the brown-tide alga, Aureococcus anophagefferens (Pelagophyceae). Phycologia: July 1998, *37*, 4, pp. 300-306, 1952, 1998.
6. *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.* Ingestion and inactivation of bacteriophages by Tetrahymena. J. Eukaryot. Microbiol. 55, 1, 44-50, 2008.
7. *Kirkland, P.D., Gleeson, A.B., Hawkes, R.A., Naim, H.M., Broughton. C.R.* Human infection with encephalomyocarditis virus in New South Wales. Med. J. Aust., 151, 176-177, 1989.
8. *Kovacs E., Bucz B.* Propagation of mammalian viruses in protista. II. Isolation of complete virus from yeast and Tetrahymena experimentally infected with picorna viral particles or their infectious RNA. Life Science, 1967, v 6, 347-358
9. *Lawrence, J. E., A. M. Chan, and C. A. Suttle.* A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga Heterosigma akashiwo (Raphidophyceae). J. Phycol. *37*, 216-222, 2001.
10. *Losina-Losinsky L.K.,* Zur Ernährungsphysiologie der Infusorien. Untersuchungen über die Nahrungsmittel und Vermehrung beiParamecium caudatum. Arch. Protistenk. *74*, 18–20, 1931.
11. *Schroeder, D.C., J. Oke, G. Malin, and W.H. Wilson.* Coccolithovirus (Phycodna-viridae): characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects Emiliania huxleyi. Arch. Virol. *147*, 1685-1698, 2002.
12. *Takao Y., Nagasaki K., Mise K., Okuno T., Honda D.* Appl. Environ. Microbiol. Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infectious to a Marine Fungoid Protist, Schizochytrium sp. (Thraustochytriaceae, Labyrinthulea), *71*, p. 4516-4522, 2005.
13. *Teras J., Kesa L., Kallas E., Jogiste A.* On the relationship between some free-living and parasitic protozoa and the DNA and RNA-viruses. Abstr. V. Intern. Congr. Protozool. New-York, p446, 1977.
14. *Yamada T., Matsumori A., Wang W.Z., Ohashi N., Shiota K., Sasayama S.* Heart Vessels. Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *14*. p. 29-37, 1999.

Ստացվել է 25.03.2013