

УДК 575:502.3:579.871.1:577.354.4

## ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ВПЛИВУ БІОТИЧНИХ ТА АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ДИФТЕРІЙНИЙ ТОКСИН

Бабич Є.М.<sup>1</sup>, Шкорбатов Ю.Г.<sup>2</sup>, Ківва Ф.В.<sup>3</sup>,  
Калініченко С.В.<sup>1</sup>, Пасюга В.М.<sup>2</sup>, Колпак С.А.<sup>1</sup>,  
Рижкова Т.А.<sup>1</sup>, Коваленко О.І.<sup>3</sup>, Антушева Т.І.<sup>1</sup>

1 – ДУ «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова АМНУ»

2 – Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна

3 – Інститут радіофізики і електроніки ім. О.Я Усикова НАН України

**Вступ.** Поширення дифтерійної інфекції може проявлятися в підвищенні рівня захворюваності чи у вигляді домінування здорового носійства патогенних коринебактерій. Зазначені особливості епідрозесу в значній мірі залежать від біологічних властивостей патогену і, в першу чергу, від інтенсивності токсинуотворюючої функції циркулюючих штамів. Тому, для прогнозування розвитку епідрозесу необхідно постійно вивчати гетерогенність популяцій *Corynebacterium diphtheriae* за кількісною характеристикою продукування зазначеного фактору патогенності, а також умов зовнішнього середовища, що можуть суттєво впливати на активність екзотоксину. Згідно з даними літератури такими чинниками можуть бути як біогенні фактори, зокрема ендотоксини мікрофлори, що перситує на слизових оболонках біологічних ніш, так й абіогенні - міліметрові електромагнітні хвилі, які входять до складу природного геомагнітного фону [1-5].

Перший етап інфекційного процесу дифтерії завжди починається з порушень епітелію в осередку колонізації збудника, що відбуваються під впливом екзотоксину. Специфічну дію дифтерійного екзотоксину на епітеліальні клітини макроорганізму можна вважати стресовим фактором. За даними літератури, на будь-який стрес еукаріотичні клітини відповідають реакцією, яка охоплює ядерний апарат та компоненти цитоплазми [6-8].

Склад хроматину тісно пов'язаний із рівнем його генетичної активності. Зниження синтетичних процесів у клітині призводить до того, що більша частина хроматину переходить у конденсований стан, тобто гетерохроматизується. При цьому явищі значно зменшується, а іноді і зовсім припиняється, синтез РНК на відповідних ділянках хроматину, що робить його недоступним для транскрипції [8]. Тому, збільшення кількості гранул гетерохроматину вказує на те, що клітини епітелію переходять до стану метаболічного спокою.

**Мета роботи:** на основі вивчення особливостей цитогенетичних змін у ядерному геномі клітин букального епітелію визначити вплив біотичних (ліпополісахарид) та абіотичних (міліметрові хвилі) факторів на дифтерійний токсин (ДТ).

Робота виконана в рамках НДР ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України» «Застосування електромагнітних полів для посилення утворення окремих метаболітів та підвищення стабільності біологічних властивостей їх продуцентів», № держреєстрації 0107U001639.

### Об'єкт і методи

У якості об'єктів використовували стандартний натуральний дифтерійний токсин (ДТ) з активністю 170 флокулюючих одиниць (Lf), наданий ЗАТ «Біолік» (м. Харків), ліпополісахарид (ЛПС) із *Escherichia coli*, отриманий в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України та клітини букального епітелію людини.

Кількість гранул гетерохроматину в інтерфазному ядрі клітин букального епітелію визначали згідно з методикою, яка була розроблена професором кафедри біотехнології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна – Ю. Г. Шкорбатовим [7]. Даний тест дозволяє за зміною кількості гетерохроматину в ядерному апараті клітин визначити ступінь небезпечності впливу того чи іншого агента на епітеліальний прошарок слизових оболонок верхніх дихальних шляхів.

Джерелом мікрохвильового випромінювання були стандартні високочастотні генератори Г4-141 і Г4-142. Діапазон частот для Г4-141:  $f_1=37,5-53,57$  ГГц; для Г4-142:  $f_2=53,57-78,33$  ГГц. Опромінення проводили за наведеною нижче методикою: кварцові пробірки, що містили бактеріальні токсини, при кімнатній температурі, без перемішування, розташовували поблизу від розкриття прямокутного рупору з перерізом 30-40 мм при використанні генератору Г4-141, та 10-20 мм при використанні генератору Г4-142. Середня щільність у розкритті рупорів досягала значення 0,1 мВт/см<sup>2</sup>. Діапазон та тривалість опромінювання змінювали згідно з потребами дослідів.

Досліди проводили у 3-5 повторюваннях. Результати обробляли статистично за допомогою персонального комп'ютера із застосуванням медико-біологічних комп'ютерних програм Biostat-4 та Statistika-6. Використовували параметричні критерії з визначенням середнього значення (M) і його стандартної помилки (m). Оцінку достовірності різниці між порівнюваними показниками визначали за допомогою критерію Ст'юдента. Різницю між показниками, що порівнювались, вважали статистично значимою при  $p < 0,05$  [9, 10].

### Результати та обговорення

Вивчення впливу неопроміненого дифтерійного екзотоксину на клітини букального епітелію показало, що даний фактор патогенності, після чотирьохгодинної експозиції, обумовлює статистично достовірне збільшення гранул хроматину в інтерфазному ядрі в 1,2-1,4 рази, а після шестигодинної експозиції – в 1,1-1,2 рази. Кількість гранул гетерохроматину після п'ятихвилинної експозиції клітин букального епітелію з екзотоксином суттєво не відрізнялись від показників контролю (табл. 1).

**Таблиця 1. Вплив дифтерійного екзотоксину на кількість гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію людини**

Чинник	Кількість гранул гетерохроматину, (M±m), через		
	5 хвилин	4 години	6 годин
фізіологічний розчин (контроль)	(7,3±0,38)	(13,56±0,62)	(16,83±0,73)
дифтерійний токсин (дослід)	(7,0±0,6)	(20,7±1,4)**	(20,95±1,4)*

**Примітки:** \* - достовірна різниця між зазначеними показниками дослідів та контролю (p<0,05); \*\* - достовірна різниця між зазначеними показниками дослідів та контролю (p≤0,001).

Отримані результати можна розцінювати як відповідну реакцію букального епітелію на дію досліджуваного чинника. Виходячи з приведених даних, для подальшої оцінки впливу ДТ на клітини букального епітелію була використана чотирьохгодинна експозиція.

Вивчення впливу опроміненого міліметровими хвилями дифтерійного токсину на одну з ознак, яка характеризує стан процесів метаболізму клітини, показало, що відповідна реакція геному суттєво не залежала від частоти коливань даного фізичного чинника (табл. 2).

**Таблиця 2. Кількість гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію після впливу дифтерійного токсину, опроміненого міліметровими хвилями різних частотних діапазонів**

Частотний діапазон, (ГГц)	Кількість гранул гетерохроматину, (M±m)
40,0	(12,9±1,1)*
42,2	(13,85±0,7)*
50,3	(13,2±0,7)*
58,0	(13,8±0,62)*
61,0	(14,45±0,96)*
64,5	(10,45±0,85)*
неопромінений ДТ	(20,5±1,4)

**Примітка:** \* - достовірна різниця між зазначеними показниками опроміненого різними частотними діапазонами міліметрових хвиль і неопроміненого дифтерійного екзотоксину (p≤0,001).

Встановлено, що опромінення міліметровими хвилями дифтерійного екзотоксину призводило до зменшення негативного впливу токсину на ядерний геном клітин букального епітелію. Так, згідно з отриманими даними, після опромінення дифтерійного токсину міліметровими хвилями у всіх зазначених частотних діапазонах (40,0 ГГц; 42,2 ГГц; 50,3 ГГц; 58,0 ГГц; 61,0 ГГц та 64,5 ГГц) кількість гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію була в 1,4-1,9 разів меншою (p≤0,001) порівняно з пробами неопроміненого екзотоксину.

Дані експерименту свідчать про те, що міліметрові хвилі зменшують токсичний вплив основного фактора патогенності токсинуотворюючих

коринебактерій на клітини букального епітелію. Результати проведених експериментів не заперечують даним, наведеним у літературних джерелах [11-15].

До найбільш суттєвих факторів, що впливають на характер міжмікробних взаємостосунків, відносять дію токсинів різних бактерій, завдяки яким мікроорганізми пригнічують розвиток інших представників біоценозів [16-18].

Бактеріальний ендотоксин є постійним структурним компонентом клітинної стінки грамнегативних бактерій. За своєю структурою він складається з довгого ланцюга жирної кислоти (ліпід А), що поєднується з полісахаридом. При звільненні ліпополісахарид проникає у біологічні рідини макроорганізму, що призводить до різних патофізіологічних ефектів, зокрема, викликає неспецифічну активацію клітин імунної системи, впливає на структуру і функції багатьох ферментних систем, посилює дію інших антигенів [19, 20].

З урахуванням зазначеного, дослідження впливу опроміненого різними частотами міліметрових хвиль ЛПС у поєднанні з дифтерійним токсином на геном еукаріотичних клітин спрямовані не тільки на розуміння міжмікробних взаємовідносин, а й на пошуки чутливих біоб'єктів, які можна було б застосовувати при експрес-дослідженні токсинуотворюючої активності збудників.

Як видно з таблиці 3, неопромінений дифтерійний токсин з додаванням однакової кількості фізіологічного розчину та ліпополісахариду викликав збільшення кількості гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію.

**Таблиця 3. Кількісна характеристика гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію під впливом опроміненого міліметровими хвилями в різних частотних діапазонах ЛПС в поєднанні з неопроміненим ДТ**

Частотний діапазон міліметрових хвиль, (ГГц)	Кількість гранул гетерохроматину, (M±m)
40,0	(18,76±0,35)
42,2	(17,92±0,35)*
50,3	(17,72±0,39)*

Частотний діапазон міліметрових хвиль, (ГГц)	Кількість гранул гетерохроматину, (M±m)
58,0	(16,88±0,34)*
61,0	(16,96±0,4)*
64,5	(18,56±0,49)
Контроль 1 (ДТ)	(19,32±0,55)
Контроль 2 (ДТ+ЛПС)	(19,72±0,43)
фізіологічний розчин	(13,36±0,48)

**Примітки:** 40,0...64,5 - неопромінений ДТ + опромінений в певних частотних діапазонах ЛПС; Контроль 1 (ДТ) – неопромінений дифтерійний токсин з фізіологічним розчином (0,1 мл фізіологічного розчину/мл ДТ); Контроль 2 (ДТ+ЛПС) – неопромінений дифтерійний токсин з неопроміненим ліпополісахаридом (0,1 мг ЛПС/мл ДТ); \* - достовірна різниця між зазначеними показниками опроміненого різними частотними діапазонами міліметрових хвиль і неопроміненого ЛПС ( $p \leq 0,01$ ).

Результати, одержані при додаванні до ДТ ліпополісахариду, опроміненого в частотних діапазонах 40,0 ГГц і 64,5 ГГц, суттєво не відрізнялись від контрольних досліджень. Застосування опроміненого міліметровими хвилями в частотних діапазонах 42,2 ГГц, 50,3 ГГц, 58,0 ГГц, 61,0 ГГц ендотоксину призводило до зменшення впливу екзотоксину на геном еукаріотичних клітин, у середньому, в 1,2 рази ( $p \leq 0,01$ ). Тобто міліметрові хвилі послаблювали негативний вплив бактеріальних токсинів.

Дана робота є першим етапом вивчення цитогенетичних ефектів впливу біотичних і абіотичних факторів на дифтерійний екзотоксин та може бути використана при розробці чутливих методів виявлення залишкової токсичності метаболітів патогенних бактерій.

## Висновки

1. Дифтерійний екзотоксин, при чотирьохгодинній експозиції, викликав достовірне ( $p < 0,05$ ) збільшення кількості гранул гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію, що свідчить про негативний вплив даного фактору патогенності на геном тест-клітин.
2. Опромінення міліметровими хвилями ДТ призводило до зменшення (в 1,4-1,9 разів ( $p \leq 0,001$ )) у порівнянні з пробами до яких було додано неопромінений токсин) кількості гранул гетерохроматину в ядрах букального епітелію та суттєво не залежало від застосованих діапазонів частот.
3. Додання ліпополісахариду до дифтерійного токсину призводило до збільшення кількості гранул гетерохроматину у ядрах клітин букального епітелію в 1,5 рази ( $p < 0,05$ ), проте не було достовірним у порівнянні з ДТ.
4. У дослідях по вивченню впливу бактеріальних токсинів на букальний епітелій людини встановлено, що міліметрові хвилі

послаблювали негативний вплив екзо- та ендотоксинів на ядерний геном еукаріотичних клітин.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Zoysa A. Eighth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and the Diphtheria Surveillance Network - June 2004: Progress is needed to sustain control of diphtheria in European Region [Електронний ресурс] / De Zoysa A, Efstratiou A. // Eurosurveillance. – 2004. – V. 9(11). – P. 489-493. – Режим доступу до журналу : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=489>
- Neal DIPNET – establishment of a dedicated surveillance network for diphtheria in Europe [Електронний ресурс] / Eurosurveillance. – 2007. – V. 12(12). – P. 754-765. – Режим доступу до журналу: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=754>
- Spika J. Current status of diphtheria in the European Region of WHO / J. Spika, N. Emiroglu // Programme and Abstracts Book : Ninth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and Diphtheria Surveillance Network; 15-17 Nov 2006; Vouliagmeni. – Greece, 2006. – P. 35.
- Белов С.В. Физико-технические и медицинские аспекты терапевтического воздействия электромагнитного излучения [Текст] / С.В. Белов, Г.Н. Змиевской, Е.Л. Кретлова // Мед. техника. – 2001. – № 5. – С. 28-32.
- Крамарев С.О. Проблемні питання інфекційних хвороб в Україні / С.О. Крамарев // Здоров'я України. – 2007. – № 2/1. – С. 7-8.
- Пресман А.С. Электромагнитная сигнализация в живой природе (факты, гипотезы, пути исследований). – М.: Темп, 2004. – 82 с.
- Shckorbatov Y.G. He-Ne laser light induced changes in the state of chromatin in human cells [Text] / Y.G. Shckorbatov // Naturwissenschaften. – 1999. – V. 86, № 9. – P. 452-453. – ISSN 0028-1042.
- Жимулев И.Ф. Молекулярная и генетическая организация гетерохроматина в хромосомах [Текст] / И.Ф. Жимулев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 2. – С. 76-82.
- Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4.
- Гельман В.Я. Медицинская информатика: практикум. [Текст] / В.Я. Гельман – СПб.: Питер, 2002. – 480 с.
- Трчунян А. Мембранотропные электромагнитные излучения КВЧ на E.coli [Текст] / А. Трчунян, Е. Огаджанян, Э. Саркисян // Биофизика. – 2001. – Т. 46, вып. 1. – С. 69-79.
- Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы [Текст] / А.Х. Тамбиев, Н.Н. Кирикова, О.В. Бецкий, Ю.В. Гуляев – М.: Радиотехника, 2003. – 175 с. ISBN 5-93-108-040-6
- Войчук С.И. Влияние радиочастотного электромагнитного излучения на чувствительность дрожжей к фунгицидным антибиотикам [Текст] / С.И. Войчук,

Е.Н. Громозова // Мікробіол. журн. - 2004. - Т. 66, №4. - С. 69-77. - ISSN 0201-8462.

Протекторное действие электромагнитного излучения (40,68 МГц) на *Saccharomyces cerevisiae* УКМ У-517 [Текст] / В.С. Подгорский, С.И. Войчук, Е.Н. Громозова, А.С. Гордиенко // Мікробіол. журн. - 2004. - Т. 66, №5. - С. 48-56. - ISSN 0201-8462.

Калініченко С.В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсиноутворюючих коринібактерій [Текст] : автореф. дис... канд. мед. наук : 03.00.07 / АМН України. - Х., 2006. - 24 с.

Рижкова Т.А. Мікробіологічна характеристика мікрофлори мигдаликів, *Corynebacterium diphtheriae* та особливості між бактеріальних взаємовідносин за аеробних і мікроаерофільних умов [Текст] : автореф. дис... канд. мед. наук : 03.00.07 / АМН України. - Х., 2009. - 24 с.

Скляр Н.І. Особливості міжмкробних взаємовідносин в біоценозах гастродуоденального тракту [Текст] / Н.І. Скляр // Вісник ХНУ: Медицина. - 2005. - №658. - С. 33-38. - ISSN 0453-8048

Бухарин О.В. Патогенетические особенности формирования бактерионосительства [Текст] / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, О.Л. Чернова // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1996. - №2. С.98-101. - ISSN 0372-9311.

Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Текст]: [учебник для вузов]: под ред. акад. РАМН А.А. Воробьева. - М.: МИА, 2004. - 691 с.: ил. - 5000 экз. - ISBN 5-89481-209-7.

Пірог Т.Б. Загальна мікробіологія : підручник [Текст] / Т.Б. Пірог - К. : НУХТ, 2004. - 471 с. - ISBN 966-612-033-Х.

УДК 575:502.3:579.871.1:577.354.4

#### ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ВПЛИВУ БІОТИЧНИХ ТА АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ НА ДИФТЕРІЙНИЙ ТОКСИН

**Бабич Є.М., Шкорбатов Ю.Г., Ківва Ф.В.,  
Калініченко С.В., Пасюга В.М., Колпак С.А.,  
Рижкова Т.А., Коваленко О.І., Антушева Т.І.**

Вивчено вплив бактеріальних токсинів на геном буккального епітелію людини. Встановлено, що дифтерійний екзотоксин негативно впливає на ядерний апарат еукаріотичних клітин, внаслідок чого відповідні ділянки хроматину переходять до стану метаболічного спокою. Опромінення дифтерійного токсину міліметровими хвилями призводить до зменшення негативного впливу зазначеного токсину на ядерний геном клітин буккального епітелію.

**Ключові слова:** бактеріальні токсини, буккальний епітелій, міліметрові хвилі.

УДК 575:502.3:579.871.1:577.354.4

#### ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЯ БИОТИЧЕСКИХ И АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТО- РОВ НА ДИФТЕРИЙНЫЙ ТОКСИН

**Бабич Е.М., Шкорбатов Ю.Г., Кивва Ф.В.,  
Калиниченко С.В., Пасюга В.М., Колпак С.А.,  
Рыжкова Т.И., Коваленко О.И., Антушева Т.И.**

Изучено влияние бактериальных токсинов на геном буккального эпителия человека. Установлено, что дифтерийный экзотоксин негативно влияет на ядер-

ный аппарат эукаріотических клеток, вследствие чего соответствующие участки хроматина переходят в состояние метаболического покоя. Облучение дифтерийного токсина миллиметровыми волнами приводит к уменьшению негативного влияния указанного токсина на ядерный геном клеток буккального эпителия.

**Ключевые слова:** бактериальные токсины, буккальный эпителий, миллиметровые волны.

UDC 575:502.3:579.871.1:577.354.4

#### CYTOGENETIC EFFECTS OF INFLUENCE OF BIOTIC AND ABIOTIC FACTORS ON DIPHTHERIA TOXIN

**Babych E.M., Shkorbatov Yu.G., Kivva F.V., Ka-  
linichenko S.V., Pasyuga V.M., Kolpak S.A.,  
Ryzhkova T.A., Kovalenko O.I., Antusheva T.I.**

The influence of bacterial toxins on genome of buccal epithelium cells was studied. It was determined, that diphtheria exotoxin had a negative influence on nuclear apparatus of eukaryotic cells. As a result of this influence the proper areas of chromatin lose their metabolic activity. Millimeter waves irradiation of diphtheria toxin resulted to reduction of the above mentioned toxin negative effects on nuclear genome of buccal epithelium cells.

**Key words:** bacterial toxins, buccal epithelium, millimeter waves.