

## ВПЛИВ МІЛІМЕТРОВИХ ХВИЛЬ НА АКТИВНІСТЬ НЕЙРАМІНІДАЗИ ТОКСИНОУТВОРЮЮЧИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

*С.В. Калініченко, Ю.Л. Волянський, Є.М. Бабич, О.Б. Колоколова, С.Л. Крестецька*  
Інститут мікробіології та імунології імені І.І.Мечникова АМН України, м. Харків

### РЕЗЮМЕ

Вивчено вплив міліметрових хвиль на активність ферменту нейрамінідази у різних токсиноутворюючих коринебактерій. Встановлено, що різні діапазони міліметрових хвиль неоднаково впливають на активність цього ферменту. Достовірне стимулювання ферменту було відмічено при впливі діапазону 61,0 ГГц. Вплив діапазону 42,2 ГГц, навпаки, пригнічував активність нейрамінідази. Отримані результати можуть бути використані при лікуванні бактеріоносців НЗВЧ-терапією.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** міліметрові хвилі, токсиноутворюючі коринебактерії, нейрамінідазна активність

Живі організми в процесі еволюції адаптувались до дії електромагнітних полів природних джерел опромінення. Відомо, що в процесах, які відбуваються в біосфері Землі взагалі та окремих організмах частково, активну участь беруть різноманітні бактерії. Штучно створені електромагнітні поля є новим фактором оточуючого середовища, і поки що достатньо не встановлено, як вони впливають (негативно чи позитивно) на метаболізм різних біологічних систем. Тому приділяється підвищена увага дослідженням ступеня і характеру впливу електромагнітних хвиль (ЕМХ) на окремі мікроорганізми, зокрема на різні збудники інфекційних хвороб [1, 2].

Відомо, що патогенні бактерії продукують ферменти, які відіграють дуже важливу роль в патогенезі хвороб. За даними різних авторів до таких ензимів відносяться: лецитіназа, ліпаза, фосфоліпаза, муциназа, нейрамінідаза, гіалуронідаза, колагеназа та ін [3, 4]. Значну увагу привертає один з ферментів мікробної агресії і інвазії – нейрамінідаза (мукополісахарид N-ацетілнейрамінілгідролаза, КФ 3.2.1.18), що обумовлено її різнобічними функціями в зв'язку з широким поширенням сіалових кислот та їх похідних у різних біологічних структурах. Патогенні коринебактерії теж продукують цей фермент. Нейрамінідаза відщеплює N-ацетілнейрамінову кислоту від глікопротеїнів слизу та поверхні клітин, а ліаза розщеплює її на піруват і N-ацетілманозамін. Продукти ферментації, в першу чергу піруват, є джерелом енергії і стимулююче діють на подальший ріст коринебактерій [4, 5].

Активізація епідемічного процесу дифтерійної інфекції в Україні і державах СНД у 90<sup>х</sup> роках, існуюча зараз спорадична захворюваність на цю інфекцію, частий розвиток ускладнень її клінічного перебігу

викликають цілу низку питань, вирішення яких пов'язано з необхідністю дослідження найрізноманітніших аспектів проблеми.

Метою роботи стало вивчення впливу міліметрових хвиль різної частоти на нейрамінідазну активність токсиноутворюючих коринебактерій.

Робота виконана в рамках наукової програми Інституту мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України “Вплив електромагнітних полів в широкому діапазоні частот на біологічні властивості збудників дифтерії та кашлюку”, № держреєстрації 0103U001403.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були 37 штамів токсиноутворюючих коринебактерій: *S.d. gravis tox+* (11), *S.d.mitis tox+* (11), *S.d. belfanti tox+* (10), *S.ulcerans tox+* (5); музейні та вилучені від здорових носіїв у період 2000-2003 рр. (м. Харків). Культури мікробів, що були вирощені на 10% сироватковому агарі, змивали стерильним фізіологічним розчином рН 7,2. Для стабілізації, культури мікробних клітин охолоджували при +4°C протягом двох годин та центрифугували 10 хвилин при 1500 об./хв. Осадок ресуспендували та доводили до оптичного стандарту щільності 1,0 одиниць за McFarland за допомогою приладу *Densi-La-Meter* (Lachema, Чехія). Опромінення культур проводили в 0,9% розчині NaCl (рН 7,2). 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: скляні пробірки, що містили клітинну суспензію, при кімнатній температурі, без перемішування, розташовували поблизу від розкриття прямокутного рупора з

перерізом 30-40 мм при використанні генератора Г4-141 та 10-20 мм при використанні генератора Г4-142. Середня щільність у розкритті рупорів досягала значення 0,1 мВт/см<sup>2</sup>. Після чого контрольні (культури, що не піддавались впливу міліметрових хвиль) та досліджені суспензії мікроорганізмів вносили до бульйону з доданням 20% кінської сироватки та 1% глюкози й інкубували 18 годин при 37°C. Культури мікробних клітин охолоджували при +4°C протягом двох годин та центрифугували 15 хвилин при 1500 об./хв. Активність нейрамінідази оцінювали за ступенем розщеплення сіалових кислот у супернатанті [6]. Щодо критеріїв активності нейромінідази, то активність ферменту вважали низьким при концентрації 0-2,0 ммоль/мл; середнім при 2,1-8,9 ммоль/мл; високим при 9,0-16,0 ммоль/мл і дуже високим при концентрації більш ніж 16,0 ммоль/мл в перерахунку на 1 г білка [7].

Кожний експеримент повторювали 3-5 разів. Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою комп'ютерних програмних пакетів Microsoft Excel 2000 та "Biostat-4". Для характеристики зміни активності ферменту використовували параметричні критерії з визначенням середнього значення (M) і його стандартного

відхилення ( $\pm m$ ). Оцінку достовірності різниці між порівнюваними показниками визначали за допомогою критерію Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Нейрамінідаза (сіалідаза, КФ 3.2.1.18) розщеплює сіалову кислоту, що входить до складу поверхневих рецепторів клітин, завдяки чому останні набувають здатності взаємодіяти з адгезинами мікробів або з їх токсинами. За допомогою цього ферменту мікроби долають перший захисний бар'єр макроорганізму – муциновий прошарок, що вкриває поверхню слизових оболонок та має значну кількість сіалових кислот. Слиз втрачає колоїдні властивості та руйнується, а епітеліальні клітини слизових оболонок, які в нормі вкриті слизом, стають доступними для колонізації. Цей фермент сприяє проникненню мікробів у клітину хазяїна і подальшому їх розповсюдженню.

Було встановлено, що всі досліджені нами штами токсиноутворюючих коринебактерій продукували фермент нейрамінідазу, але в різних концентраціях: музейні штами мали низьку концентрацію цього ферменту, а циркулюючі штами – від середньої до дуже високої (рис. 1).

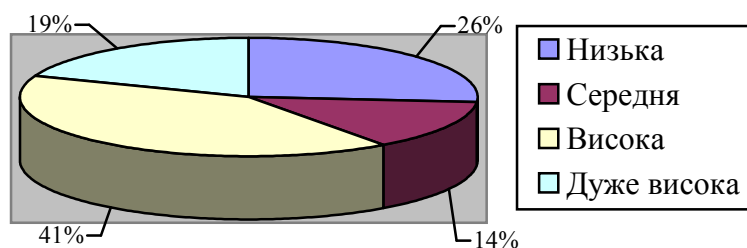


Рис. 1. Розподіл досліджених штамів за активністю нейрамінідази

Серед біоваріантів збудників дифтерії розподіл ензиму за активністю був таким: у *S.d.gravis tox+* - низька активність ферменту була у 27,2%; середня активність – у 18,18%; висока – у 36,36%; дуже висока – у 18,18% досліджених культур. Серед штамів біоваріанту *S.d.mitis tox+* був такий розподіл активності нейрамінідази: низькою активністю володіли 27,3% досліджених культур; високою – теж 27,3%; дуже високою – 45,4%. Ферментативна активність ізолятів біоваріанту *S.d.belfanti tox+*

розподілялась таким чином: усі музейні культури мали низьку активність нейрамінідази, а всі циркулюючі штами – високу активність, в той час як всі досліджені культури патогенного дифтероїда - *S.ulcerans tox+* мали середню активність нейрамінідази (табл. 1.).

Активність нейрамінідази музейних штамів була від 0,08 ммоль/мл до 1,9 ммоль/мл, залежно від виду та біоваріанту культур (табл. 2.).

Таблиця 1  
Активність нейрамінідази у циркулюючих штамів різних токсигенних коринебактерій (M $\pm$ m), ммоль/мл

Фермент	Токсинуотворюючі коринебактерії			
	<i>S.d.gravis tox+</i>	<i>S.d.mitis tox +</i>	<i>S.d.belfanti tox+</i>	<i>S.ulcerans tox+</i>

нейрамінідаза	12,67±0,17	14,25±0,04	12,16±0,04	5,39±0,05
---------------	------------	------------	------------	-----------

Таблиця 2

**Активність нейрамінідази у музейних штамів різних токсигенних коринебактерій (M±m), ммоль/мл**

Фермент	Біоваріанти токсинотворюючих коринебактерій			
	C.d.gravis tox+	C.d.mitis tox+	C.d.belfanti tox+	C.ulcerans tox+
нейрамінідаза	0,96±0,04	1,74±0,026	1,39±0,04	0,145±0,025

Таблиця 3

**Зміна активності нейромінідази у C.d.gravis tox+, залежно від діапазону впливу міліметровими хвилями (M±m), ммоль/мл**

Фермент	Діапазон частоти впливу (ГГц)	C.d.gravis tox+			
		штами з низькою активністю	штами з середньою активністю	штами з високою активністю	штами з дуже високою активністю
Нейрамінідаза	40,0 ГГц	0,96±0,02	8,19±0,15	11,84±0,19	17,01±0,19
	42,2 ГГц	0,31±0,03**	4,63±0,06**	8,51±0,2**	11,62±0,13**
	50,3 ГГц	0,68±0,05**	8,21±0,14	11,55±0,19*	16,78±0,16*
	58,0 ГГц	0,99±0,03	8,93±0,14*	12,41±0,11	17,5±0,12
	61,0 ГГц	1,45±0,05**	13,1±0,17**	15,78±0,2**	20,02±0,1**
	64,5 ГГц	0,93±0,01	8,76±0,16	12,28±0,18	17,43±0,12
	контроль	0,96±0,04	8,61±0,2	12,14±0,15	17,28±0,17

\* - різниця достовірна, p≤0,05; \*\* - різниця достовірна, p<0,001

При вивченні впливу міліметрових хвиль різних діапазонів були отримані такі результати: у всіх досліджених штамів спостерігалась зміна активності нейрамінідази при впливі міліметрових хвиль діапазонів 42,2 ГГц і 61,0 ГГц, а у деяких штамів – при діапазонах 40,0 ГГц, 50,3 ГГц, 58,0 ГГц, 61,0 ГГц і 64,5 ГГц (табл. 3-6.).

Як видно з табл. 3, зміна активності нейрамінідази під впливом діапазону 42,2 ГГц знижувалась у три рази у музейних і в

1,53 рази у циркулюючих штамів. При застосуванні діапазону 50,3 ГГц також відмічали пригнічення активності дослідженого ферменту, але незначне: у музейних штамів активність нейрамінідази пригнічувалась в 1,41 раз, а у циркулюючих штамів – в 1,02 рази. При впливі діапазону 61,0 ГГц нами було відмічено стимуляцію активності ферменту нейрамінідази: серед музейних культур – в 1,51 рази, а серед циркулюючих штамів – в 1,36 рази (в середньому).

Таблиця 4

**Зміна активності нейромінідази у C.d.mitis tox+, залежно від діапазону впливу міліметровими хвилями (M±m), ммоль/мл**

Фермент	Діапазон частоти впливу (ГГц)	C.d.mitis tox+		
		штами з низькою активністю	штами з високою активністю	штами з дуже високою активністю
Нейрамінідаза	40,0 ГГц	1,74±0,02	11,23±0,02	17,34±0,03
	42,2 ГГц	1,05±0,07**	8,3±0,06**	14,24±0,05**
	50,3 ГГц	1,45±0,03**	10,5±0,03**	16,79±0,03**
	58,0 ГГц	1,8±0,02	11,32±0,02	17,46±0,03
	61,0 ГГц	3,67±0,06**	13,74±0,04**	19,8±0,06**
	64,5 ГГц	1,74±0,016	11,19±0,03	17,37±0,03
	контроль	1,74±0,026	11,24±0,03	17,27±0,05

\*\* - різниця достовірна, p<0,001

Таблиця 5

**Зміна активності нейромінідази у C.d.belfanti tox+, залежно від діапазону впливу міліметровими хвилями (M±m), ммоль/мл**

Фермент	Діапазон частоти впливу (ГГц)	C.d.belfanti tox+	
		штами з низькою активністю	штами з дуже високою активністю
Нейрамінідаза	40,0 ГГц	1,47±0,03*	12,32±0,035*
	42,2 ГГц	0,81±0,03**	8,61±0,04**
	50,3 ГГц	1,05±0,04**	11,57±0,036**

	58,0 ГГц	2,6±0,04**	13,22±0,042**
	61,0 ГГц	3,33±0,02**	15,13±0,05**
	64,5 ГГц	1,23±0,03*	12,04±0,036*
	Контроль	1,39±0,04	12,16±0,04

\* - різниця достовірна,  $p < 0,05$ , \*\* - різниця достовірна,  $p < 0,001$

• Таблиця 6

**Зміна активності нейрамінідази у *S.ulcerans tox+*, залежно від діапазону впливу міліметровими хвилями ( $M \pm m$ ), ммоль/мл**

Фермент	Діапазон частоти впливу (ГГц)	<i>S.ulcerans tox+</i>	
		штами з низькою активністю	штами з середньою активністю
Нейрамінідаза	40,0 ГГц	0,075±0,015**	4,1±0,04**
	42,2 ГГц	0,053±0,01**	3,59±0,04**
	50,3 ГГц	0,14±0,02	5,49±0,03
	58,0 ГГц	0,13±0,015	5,37±0,03
	61,0 ГГц	0,33±0,025**	7,67±0,04**
	64,5 ГГц	0,23±0,03*	6,67±0,07*
	контроль	0,145±0,025	5,39±0,05

\* - різниця достовірна,  $p < 0,05$ , \*\* - різниця достовірна,  $p < 0,001$

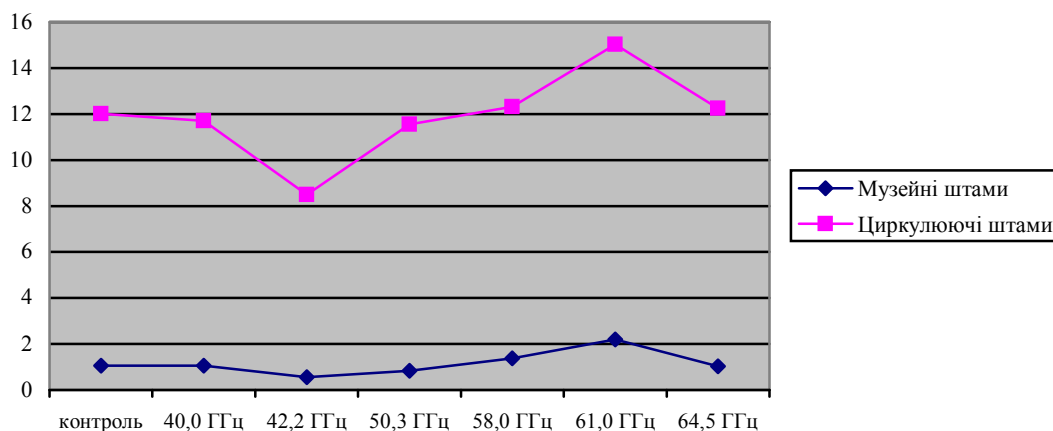
У той же час серед досліджених штамів біоваріанту *S.d.mitis tox+* не було культур з середньою активністю цього ферменту. Культури *S.d.mitis tox+* реагували на діапазони 42,2 ГГц, 50,3 ГГц і 61,0 ГГц. Так у музейних культур відмічено зниження активності нейрамінідази при впливі діапазонів 42,2 ГГц і 50,3 ГГц в 1,65 і 1,2 рази відповідно та підвищення активності цього ензиму в 2,1 рази при впливі діапазону 61,0 ГГц. У циркулюючих культур зниження ферменту було в середньому в 1,28 та 1,05 рази відповідно, а стимулювання при діапазоні 61,0 ГГц – в 1,18 рази.

На відміну від вище приведених даних, усі циркулюючі культури біоваріанту *S.d.belfanti tox* мали дуже високу активність нейрамінідазного ферменту. Вони реагували практично на всі досліджені діапазони міліметрових хвиль. Суттєво достовірну різницю відмічено при впливі діапазонів 42,2 ГГц, 50,3 ГГц, 58,0 ГГц і 61,0 ГГц. Нами було відмічено, що при впливі діапазонів 42,2 ГГц і 50,3 ГГц відбувалось пригнічення

нейрамінідази (серед музейних штамів в 1,71 і 1,32 рази; а серед свіжовилучених – в 1,41 і 1,05 рази відповідно), а при впливі діапазонів 58,0 ГГц і 61,0 ГГц, навпаки, стимулювання (серед штамів з низькою активністю – в 1,87 і 2,39 рази, а серед штамів з дуже високою активністю – в 1,08 і 1,24 рази відповідно). Діапазон 40,0 ГГц незначно підвищував, а діапазон 64,5 ГГц незначно знижував активність ферменту, що досліджувався.

Як було відмічено вище, всі циркулюючі штами *S.ulcerans tox+* мали середню активність нейрамінідази та реагували на вплив таких діапазонів: 40,0 ГГц, 42,2 ГГц, 61,0 ГГц і 64,5 ГГц, причому діапазони 40,0 ГГц і 42,2 ГГц пригнічували активність ферменту, а діапазони 61,0 ГГц і 64,5 ГГц – підвищували.

Таким чином, приведені дані показують залежність активності ферменту нейрамінідази від діапазону міліметрових хвиль (рис. 2.).



**Рис. 2.** Залежність зміни активності нейрамінідази у музейних та циркулюючих штамів від діапазону міліметрових хвиль

## ВИСНОВКИ

1. Токсинуотворюючі коринебактерії неоднаково реагують на вплив різного діапазону міліметрових хвиль
2. Вплив діапазону 42,2 ГГц у всіх досліджених культур патогенних коринебактерій викликав пригнічення активності нейрамінідази
3. Вплив діапазону 61,0 ГГц, навпаки, стимулював активність нейрамінідази у всіх досліджених коринебактерій
4. Було встановлено незначне пригнічування активності нейрамінідази при впливі діапазону 50,3 ГГц, а при впливі діапазону 64,5 ГГц – незначне підвищення ак-

тивності ферменту у деяких досліджених культур

Відомо, що фермент нейрамінідази відіграє важливу роль у розвитку інфекційного процесу, в багато в чому обумовлюючи колонізаційну здатність мікробів [3]. Тому вивчення змін нейрамінідазної активності під впливом електромагнітних хвиль міліметрового діапазону, які застосовуються при НЗВЧ-терапії, має суттєву перспективу. Це може бути використано для боротьби при носійстві цих збудників, бо, втративши колонізаційну здатність, бактерії, як правило, не спроможні викликати захворювання

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бирюкова С.В., Манина Ж.Н., Грабина В.А., и др. // Тез. Междунар. Конгресса «Ликвидация и элиминация инфекционных болезней – прогресс и проблемы», (4-5-сентября 2003 г.) -С.-Петербург. – 2003. - С. 22.
2. Куляш Ю.В., Лепилин А.В., Семенова О.П., и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. - 1998. - № 5. - С. 33-36.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А.А. Воробьева. - М.:МИА. - 2004. - 691 с.
4. Усвятков Б.Я., Кирилличев А.И., Воронина Л.Г., и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. - 1997. - № 4. - С. 102-105.
5. Ждамарова Л.А. // Дитячі інфекції. - 2001. - № 28. - С. 32-37.
6. Методические указания к лабораторным работам по клин. биохимии. Харьков: УИУВ, каф. мед. биохимии. - 1988. - 116 с.
7. Вишнякова Л.А., Резцова Ю.В. // Журн. микроб., эпидем. и иммунол. - 1999. - № 2. - С. 108-109.

## ВЛИЯНИЕ МИЛЛИМЕТРОВЫХ ВОЛН НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ТОКСИГЕННЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

*С.В. Калиниченко, Ю.Л. Волянский, Е.М. Бабич, О.Б. Колоколова, С.Л. Крестецкая*

Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины, г. Харьков

## РЕЗЮМЕ

Изучено влияние миллиметровых волн на активность фермента нейраминидазы у различных токсинообразующих коринебактерий. Установлено, что различные диапазоны миллиметровых волн неодинаково влияют на активность данного фермента. Достоверную стимуляцию фермента было отмечено при влиянии на культуры диапазона 61,0 ГГц. Влияние диапазона 42,2 ГГц, наоборот, угнетало активность нейраминидазы. Полученные результаты могут быть использованы при лечении бактерионосителей КВЧ-терапией.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** миллиметровые волны, токсинообразующие коринебактерии, нейраминидазная активность

## THE NEIRAMINIDASES ACTIVITY OF TOXINFORMING CORYNEBACTERIA BEFORE AND AFTER THE MILLIMETER WAVES INFLUENCE

*S.V. Kalinichenko, Yu.L. Voljanski, E.M. Babich, O.B. Kolokolova, S.L. Krestezkay*

I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of AMS of Ukraine, Kharkov

## SUMMARY

The influence of the millimeter waves on the enzymatic activity of neiraminidase of different Corynebacteria was studied. It is established, that the effects of different diapasons of millimeter waves on the activity of this enzyme differs. The reliable stimulation of enzyme was remarked under influence of 61,0

HHz. The influence of 42.2 HHz diapasone, in contrast, inhibited the neiraminidase activity. The obtained data can be used in the extra high frequency therapy of bacteriocarriers of the toxigenic strains of Corynebacteria.

**KEY WORDS:** millimeter waves, toxinforming Corynebacteria, neiraminidases activity