

УДК 579.871.1:576.524:57.04:[537.868+534-8]

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА И ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЛН МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА C. DIPHTHERIAE

¹Антушева Т.И., ¹Бабич Е.М., ²Кивва Ф.В., ¹Калиниченко С.В., ¹Рыжкова Т.А.,
¹Скляр Н.И., ²Коваленко О.И.

¹ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии
медицинских наук Украины» (ИМИ НАМН), Харьков, e-mail: antushevati@rambler.ru;

²Институт радиофизики и электроники им. О.Я. Усикова Национальной академии наук Украины
(ИРЭ НАНУ), Харьков

Изучены изменения основных показателей адгезии у патогенных коринебактерий после облучения низкочастотным ультразвуком (УЗ) и миллиметровыми волнами в частотных диапазонах 42,2 ГГц и 61,0 ГГц. Под влиянием УЗ адгезивная активность уменьшалась пропорционально времени воздействия фактора (в 2,0 – 2,7 раза). Облучение бактерий миллиметровыми волнами приводило к разнонаправленным эффектам – при использовании волн с частотой 42,2 ГГц адгезия снижалась, а в случае частоты 61,0 ГГц возросла почти в 2 раза. Комплексное применение физических факторов усиливало эффекты монофакторного влияния на адгезию микроорганизмов. В Ключевые слова: ультразвук, миллиметровые волны, адгезия, патогенные коринебактерии

THE INFLUENCE OF ULTRASOUND AND MILLIMETER WAVES ON ADHESIVE PROPERTIES OF C.DIPHTHERIAE

¹Antusheva T.I., ¹Babych E.M., ²Kivva F.V., ¹Kalinichenko S.V., ¹Ryzhkova T.A.,
¹Sklyar N.I., ²Kovalenko O.I.

¹SI «Mechnicov institute of microbiology and immunology of AMS of Ukraine», Kharkov,
e-mail: antushevati@rambler.ru;

²O.Y. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kharkov

The changes of pathogenic Corynebacterium indices under influence of low-frequency ultrasound and millimeter waves in 42,2 and 61,0 GHz frequency ranges were studied. Adhesive activity of diphtheria causative agents decreased 2,0-2,7 fold under ultrasound influence proportional to time of influence. Irradiation of pathogens with millimeter waves resulted in differently directed effects. Adhesiveness of Corynebacteria decreased after treatment with millimeter waves in 42,2 GHz frequency range and increased nearly twofold under influence of millimeter waves in 61,0 GHz frequency range. Combined application of these physical factors intensified effect on bacterial adhesion in comparison with their independent influence.

Keywords: ultrasound, millimeter waves, adhesion, pathogenic Corynebacterium

Работа является фрагментом плановых научно-исследовательских работ ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины» «Применение электромагнитных полей (ЭМП) для усиления образования некоторых метаболитов и повышения стабильности биологических свойств их продуцентов» отраслевой шифр АМН 74/2007, № госрегистрации 0107U001639 (отмечена дипломом Президиума НАМН Украины, как лучшая, выполненная в 2009 г.) и «Иммунобиологическая характеристика отдельных фракций дифтерийного, столбнячного анатоксинов и определение режимов модификаций экзотоксинов физико-химическими методами» отраслевой шифр АМН 92/2009, № госрегистрации 0110U001414.

Одной из приоритетных задач современной микробиологии являются вопросы

целенаправленного воздействия определенными факторами (физическими, химическими, др.) на бактерии с целью модификации их биологических свойств, что открывает возможности влиять на ослабление патогенного потенциала эпидемически значимых инфекций, таких, как дифтерия [2, 5].

Известно, что ключевым механизмом колонизации микроорганизмами слизистых оболочек является адгезия [4]. Роль адгезинов у грамм-положительных бактерий выполняют поверхностные белки клеточных стенок, липополисахариды, тейхоевые кислоты, а возбудители дифтерии в качестве адгезинов используют также фимбриии [6]. Микробные адгезины обеспечивают специфическую адгезию, образуя лиганд-рецепторные взаимодействия с соответствующими клетками хозяина – сайты связи на цитолемме эукариотических клеток. Интен-

сивность лиганд-рецепторных взаимодействий между прокариотическими и эукариотическими клетками существенно зависит от электростатических сил между ними, которые обеспечивают механизм неспецифической адгезии [10].

Из литературных источников известно, что воздействие некоторых абиотических факторов может вызывать определенные адаптивные изменения биологических свойств бактерий, но влияние именно физических факторов на живые микроорганизмы изучено еще недостаточно. Особого внимания заслуживают ультразвуковые и низкоинтенсивные электромагнитные волны [3, 8, 9]. Под воздействием ультразвука (УЗ) может возникать в коллоидных растворах и суспензиях электрический вибропотенциал Дебая, что приводит к изменению концентрации ионов как внутри клеток, так и на поверхности. Кроме того, возникающие процессы кавитации способствуют диссоциации молекул воды, образуя свободные активные радикалы, что лежит в основе применения УЗ для ускорения химико-технологических процессов [1]. В результате вышеописанных реакций инициализируются химические процессы, которые могут приводить к разрыву химических связей макромолекул, что в свою очередь способствует разнообразным биологическим эффектам, в том числе и к изменению адгезивной активности прокариотических клеток. Однако возможность влияния УЗ на активность колонизации патогенных бактерий изучена недостаточно. Электромагнитные поля могут при этом изменять эффекты ультразвукового влияния на биообъекты в ту или другую сторону, изменяя уровень электростатических сил и направленность электромагнитного поля [3, 8].

Цель работы: определить влияние ультразвука и электромагнитных волн миллиметрового диапазона на колонизационные свойства возбудителей дифтерии.

Материалы и методы исследования

Адгезивную активность до и после воздействия ультразвуковых и миллиметровых волн определяли у 19 музейных и 21 циркулирующих штаммов патогенных коринебактерий.

Изучение адгезивных свойств микроорганизмов проводили по методике В.И. Бриллиса с соавторами [7]. Активность адгезивного процесса оценивали по среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту адгезии (КА) и индексу адгезивности микроорганизмов (ИАМ). Микроорганизмы считали неадгезивными при $ИАМ \leq 1,75$; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0, и высокоадгезивными при ИАМ более 4,0.

Для облучения микроорганизмов электромагнитным полем в узких полосах частот (квазигармонический сигнал) КВЧ-диапазона использовались генераторы сигналов Г4-141 (37,5–53,57) ГГц и Г4-142 (53,57–78,33) ГГц при их средней мощности излучения $P_{\text{ср}} \leq 5$ мВт, нагруженные на согласованные рупорные антенны, имеющие на выходе площадь раскрыва (апертуру) $S \approx 40$ см².

В качестве источника ультразвуковых излучений использован низкочастотный генератор сигналов ГЗ-109, нагруженный на кольцевой пьезокерамический преобразователь-излучатель типа ЦТС, работающий на частоте 60 кГц. Все использованные в опытах приборы были предоставлены Институтом радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины.

Суспензию микроорганизмов готовили в соответствии с оптическим стандартом мутности 1,0 единиц по шкале McFarland с помощью прибора Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema, Чехия), синхронизацию культур проводили действием низкой температуры (–6 °С). На тест-культуры воздействовали ультразвуком в течение от 1 до 7 часов, облучение электромагнитными волнами продолжалось 1 час до действия УЗ или 1 час после с частотами 42,2 ГГц или 61,0 ГГц.

Режимы воздействия физических факторов на коринебактерии были следующие:

Воздействие отдельно ультразвуком с частотой 60 кГц от 1 часа до 7 часов непрерывно;

Облучение отдельно сверхвысокочастотными волнами (СВЧ-волны) миллиметрового диапазона с частотой 42,2 ГГц или 61,0 ГГц в течение 1 часа;

Облучение миллиметровыми волнами с частотой 42,2 ГГц в течение 1-го часа с последующим воздействием ультразвуком частоты 60 кГц от 1 часа до 7 часов (СВЧ-волны 42,2 ГГц + УЗ);

Облучение ультразвуком с частотой 60 кГц от 1 часа до 7 часов с последующим облучением миллиметровыми волнами с частотой 42,2 ГГц в течение 1-го часа после каждого времени действия УЗ (УЗ + СВЧ-волны 42,2 ГГц);

Облучение миллиметровыми волнами с частотой 61,0 ГГц в течение 1-го часа с последующим воздействием ультразвуком частоты 60 кГц от 1 часа до 7 часов (СВЧ-волны 61,0 ГГц + УЗ);

Облучение ультразвуком частоты 60 кГц от 1 часа до 7 часов с последующим облучением миллиметровыми волнами с частотой 61,0 ГГц в течение 1-го часа после каждого времени действия УЗ (УЗ + СВЧ-волны 61,0 ГГц).

Контролем культур были клеточные суспензии коринебактерий, не подвергшиеся воздействию физических факторов.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении показателей адгезии исходных штаммов коринебактерий отмечено, что большинство (70%) циркулирующих культур были высокоадгезивны ($ИАМ \geq 4$), 30% – среднеадгезивны ($ИАМ$ от 2,51 до 4,0). Низкоадгезивных патогенов выявлено не было. Музейные штаммы были менее активными и обладали среднеадгезивными свойствами ($ИАМ$ 3,08 – 3,41). В среднем циркулирующие штаммы харак-

теризовались следующими показателями адгезивного процесса: СПА ($4,08 \pm 0,15$), КА ($84,26 \pm 0,9$), ИАМ ($4,78 \pm 0,16$); а музейные: СПА ($2,64 \pm 0,12$), КА ($73,65 \pm 0,95$), ИАМ ($3,25 \pm 0,17$).

В процессе экспериментов по изучению отдельного влияния УЗ установлено, что после воздействия ультразвукового поля адгезивная активность уменьшалась как у музейных, так и у циркулирующих штаммов коринебактерий. При проведении корреляционного анализа установлена

практически линейная обратная зависимость адгезивной активности коринебактерий от продолжительности действия на бактерии ультразвука ($r = -0,98$ для СПА та $r = -0,99$ для показателей КА и ИАМ). Таким образом, экспериментально доказано, что влияние УЗ приводило к снижению всех показателей адгезивного процесса, причем степень угнетения адгезивного потенциала прямо пропорционально зависела от времени воздействия УЗ на бактерии (рис.1, 2).

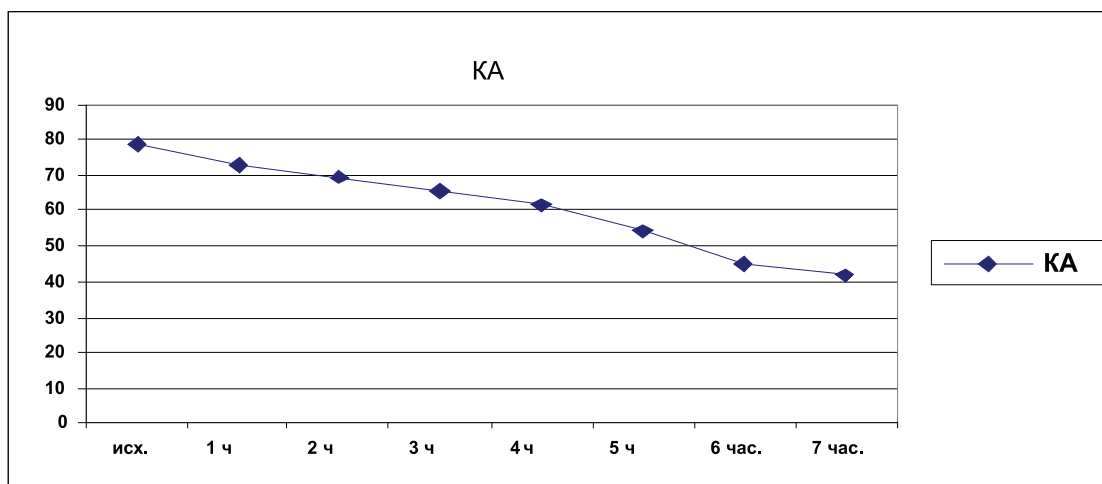


Рис. 1. Средние показатели КА (музейных и циркулирующих штаммов коринебактерий) в зависимости от времени воздействия ультразвука

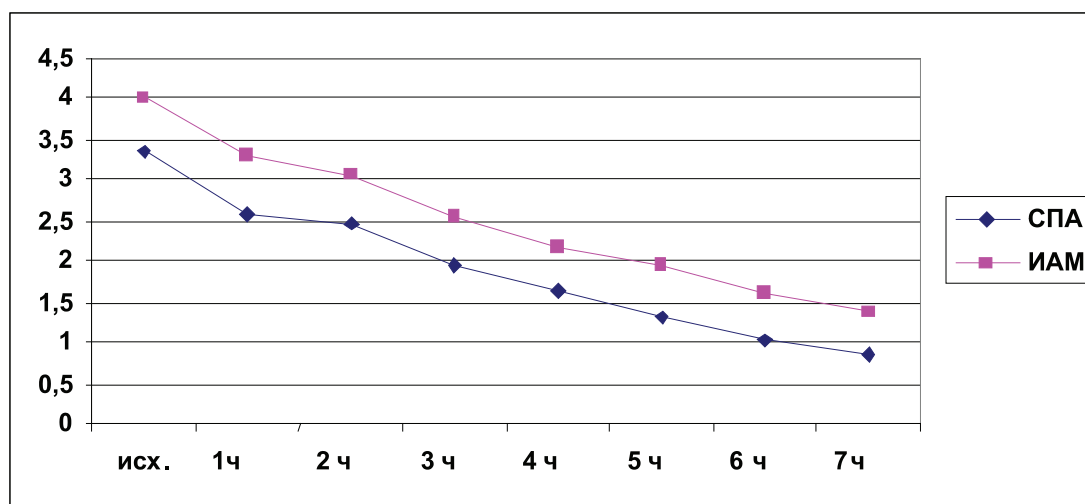


Рис. 2. Средние показатели СПА и ИАМ (музейных и циркулирующих штаммов коринебактерий) в зависимости от времени воздействия ультразвука

При выборе следующего направления исследований руководствовались тем, что действие миллиметровых волн может, в первую очередь, повлиять на электростатические силы системы «патогенный агент – клетка хозяина». Допускалась также и возможность изменения концентрации самих адгезинов на поверхности взятых в опыты бактерий после их облучения в различных частотных диапазонах. Предшествующие исследования показали адаптированную реакцию тест-культур на действие миллиметровых волн двух диапазонов – 42,2 ГГц и 61,0 ГГц. Именно этот спектр был применен в настоящей работе.

Облучение исследуемых штаммов в частотном диапазоне 42,2 ГГц привело к выраженному снижению адгезивных свойств у представителей патогенных коринебактерий. Так, среднее количество прикрепленных к одному эритроциту бактерий (СПА) снизилось по сравнению с контрольными (необлученными) культурами у музейных штаммов в 1,7 раза ($p < 0,01$), КА – на $28,95 \pm 1,1\%$ ($p < 0,05$); а в случае циркулирующих штаммов – соответственно в 1,8 раза ($p < 0,01$) и в 1,6 раза. Миллиметровые волны с частотой 61,0 ГГц вызывали у облученных культур коринебактерий противоположный эффект, характеризующийся повышением показателей адгезивной активности как у музейных, так и у циркулирующих тест-штаммов: музейные представители возбудителей дифтерии повышали СПА в 1,6 раза ($p < 0,05$), КА в 1,2 раза ($p < 0,05$), а циркулирующие в 1,7 раза ($p < 0,001$) и в 1,05 раза соответственно.

Приведенные результаты эксперимента демонстрируют зависимость адгезивной активности исследуемых культур от диапазона облучения. Выявленные разнонаправленные эффекты влияния электромагнитных волн миллиметрового диапазона на изменение адгезивности патогенных коринебактерий свойственны в одинаковой степени всем исследуемым тест-культурам независимо от видовой принадлежности. Возможно, электромагнитное поле способствует возбуждению электронной энергии атомов и молекул, что может приводить к изменению реакционных возможностей некоторых участков биомолекул микроорганизмов, обеспечивающих колонизацию.

Совместное влияние на микроорганизмы нескольких физических факторов изучали путем их последовательного применения непосредственно друг за другом. В ходе опы-

тов установлено, что эффекты комплексного воздействия на патогенные коринебактерии мало зависели от первоочередности применения ультразвуковых и электромагнитных волн, а в большей степени зависели от времени действия УЗ и частоты СВЧ-волн.

Показатели адгезивной активности, как музейных, так и циркулирующих тест-штаммов *C. diphtheriae*, после первоочередного воздействия миллиметровых волн с частотой 42,2 ГГц с последующим действием УЗ в течение 4 – 7 часов уменьшались по сравнению с контролем, в среднем, в 1,07 – 2,2 раза ($p < 0,05$), в зависимости от времени действия УЗ. При первоочередном применении УЗ с последующим облучением патогенов СВЧ-волнами 42,2 ГГц наблюдалась идентичная тенденция к снижению всех показателей адгезивного процесса.

Комбинированное (последовательное) облучение СВЧ-волнами с частотой 61,0 ГГц с дальнейшим воздействием УЗ в течение 1-3 часа стимулировало способность к адгезии у циркулирующих возбудителей дифтерийной инфекции (СПА в 1,4 раза, ИАМ в 1,22 раза ($p \leq 0,05$), а также повышало показатель КА музейных культур (на 12,9% ($p < 0,01$)). Достоверное снижение показателей адгезивного процесса после данного режима воздействия наблюдалось только при действии УЗ более 4-х часов. При первоочередном облучении бактерий ультразвуком от 1 до 3-х часов с последующим воздействием СВЧ-волнами частотой 61,0 ГГц все показатели адгезии музейных и циркулирующих тест-штаммов превышали исходные значения. При этом, у циркулирующих штаммов патогенных коринебактерий показатели СПА и ИАМ возрастали в 1,25 – 1,6 раза ($p < 0,01$) по отношению к значениям контрольных образцов, в то время как у музейных – в 1,03 – 1,43 раза ($p = 0,05$) соответственно (таблица).

Таким образом, комплексное облучение УЗ и СВЧ-волнами с частотой 42,2 ГГц приводит к снижению адгезивных характеристик патогенных коринебактерий по сравнению с их исходными показателями, в то время как воздействие УЗ и СВЧ-волн с частотой 61,0 ГГц повышает основные показатели адгезии при условии непрерывного действия УЗ на микроорганизмы в течение от 1-го до 3-х часов, снижая их при более длительном влиянии ультразвука. Тем не менее, все показатели адгезии при комплексном применении физических факторов были выше, чем при облучении только УЗ.

Средние показатели адгезивности штаммов *C.diphtheriae* после облучения миллиметровыми волнами и ультразвуком

Режимы чередования физических факторов	Продолжительность УЗ, час	Тест-штаммы коринебактерий дифтерии					
		Циркулирующие штаммы			Музейные штаммы		
		СПА	КА	ИАМ	СПА	КА	ИАМ
СВЧ 42,2 ГГц + УЗ	1-3	3,34±0,2	78,70±0,2	3,82±0,3	2,12±0,2	67,95±2,3	2,71±0,3
	4-6	2,94±0,6*	68,15±1,5*	3,04±0,2*	1,54±0,3*	55,10±2,1*	2,20±0,3*
	7	1,87±0,2*	62,25±1,9*	2,48±0,1*	1,25±0,1*	43,70±3,5*	1,85±0,3*
УЗ + СВЧ 42,2 ГГц	1-3	3,59±0,4	80,50±0,6	4,11±0,3	2,39±0,2	69,65±1,5	2,92±0,3
	4-6	2,83±0,1*	73,01±3,8*	3,45±0,1*	1,79±0,2*	61,39±2,0*	2,25±0,2*
	7	2,32±0,2*	68,20±2,7*	2,98±0,1*	1,48±0,3*	54,00±2,6*	1,91±0,2*
СВЧ 61,0 ГГц + УЗ	1-3	5,63±0,1*	84,35±4,6	5,86±0,2*	3,00±0,2	84,54±2,1*	3,48±0,1
	4-6	4,52±0,1*	77,46±2,7	5,06±0,1	2,14±0,2	73,65±1,0	2,39±0,3*
	7	3,69±0,1	73,02±1,7*	4,38±0,2	1,65±0,1*	70,95±0,9*	2,19±0,4*
УЗ + СВЧ 61,0 ГГц	1-3	6,55±0,1*	85,93±0,3	7,17±0,1*	3,79±0,3*	84,58±1,6*	4,42±0,3*
	4-6	5,42±0,5*	82,85±4,1	6,07±0,3*	2,96±0,4	77,24±2,6*	3,37±0,4
	7	4,54±0,6*	75,55±1,9*	5,10±0,5*	2,34±0,2	71,55±2,3*	2,85±0,5
Контроль культур	4,08±0,1	84,22±0,9	4,78±0,3	2,64±0,2	73,65±0,9	3,25±0,2	

Примечание. * – разница достоверна, $p < 0,05$.

Выводы. Под влиянием УЗ адгезивная активность уменьшалась пропорционально времени воздействия фактора (в 2,0 – 2,7 раза). Облучение бактерий миллиметровыми волнами приводило к разнонаправленным эффектам – при использовании волн с частотой 42,2 ГГц адгезия снижалась, а в случае частоты 61,0 ГГц возрастала почти в 2 раза. Комплексное применение физических факторов усиливает эффекты монофакторного влияния на адгезию микроорганизмов, что может быть использовано при разработке клеточных вакцин для ослабления патогенных свойств тест-штаммов. Результаты эксперимента также имеют важное значение для понимания процессов адаптации патогенных бактерий к неблагоприятным условиям, их изменчивости, изменению колонизационных свойств.

Список литературы

1. Акопян В.Б., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами: Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии – М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. – 224 с.
2. Бабич Є.М. Імунобіологічна характеристика окремих фракцій правцевого анатоксину до та після впливу ультразвукових хвиль [Електронний ресурс] / Є.М. Бабич,

С.В. Калініченко, О.В. Рябовіл, [та ін.] // *Аннали Мечниковського інституту*. – 2012. – № 3. – С.25-31. – Режим доступа: <http://www.imiamn.org/journal.htm> (дата обращения 14.11.2013).

3. Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В. Электромагнитные волны и живые организмы // *Радиотехника*. – 1996. – № 9. – С. 89-92.

4. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.* – 2000. – № 4 (прил.). – С. 4-7.

5. Калініченко С. В. Вплив фізичних та фізико-хімічних чинників на імунобіологічні властивості дифтерійного токсину [Електронний ресурс] / С. В. Калініченко, Є. М. Бабич, Ф. В. Ківа [та ін.] // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2011. – № 4 – С. 316-320. – Режим доступу : www.imiamn.org.ua/journal.htm (дата обращения 12.11.2013)

6. Костюкова Н.Н. Значение адгезии *C.diphtheriae* в эпидемиологии дифтерии // Тезисы докл. IV Всерос. съезда микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Нижний Новгород. – 1991. – Т.1. – С. 34-35.

7. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. // *Лабораторное дело*. – 1986. – № 4. – С. 112-114.

8. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы / А.Х. Тамбиев, Н.Н. Кирикова, О.В. Бецкий, Ю.В. Гуляев / Под ред. Ю.В. Гуляева и А.Х. Тамбиева. – М.: Радиотехника, 2003. – 175 с.

9. Сорока С.А. Влияние акустических колебаний на биологические объекты // *Вибрация в технике и технологиях*. – 2005. – № 1. – С. 39 – 41.

10. Bacterial adhesions: Function and structure / Klemm P., Schembri M.A. et. al. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2001. – V.293. – P. 34-39.