

Abstract**Isaenko O.Yu.***Mechnikov institute of microbiology and immunology of national academy of medical sciences of Ukraine**14-Puschinskaya St., Kharkov, 61057, Ukraine***THE STUDY OF HETEROCHROMATIN IN NUCLEI OF BUCCAL EPITHELIAL CELLS AFTER THE LOADING OF B.PERTUSSIS ANTIGEN, TAKEN IN DEFFERENT ULTRASOUND FREQUENCY**

While carrying out series of experiments we supposed that mild receptor interaction between pertussis pathogen antigens and epithelial cells can effect the functional activity of the test-cells, have an impact on the nucleus chromatin structure that would help to use this method as an additional test for evaluating the harmfulness of pertussis vaccine candidate drugs.

The goal of this work was to study the influence of B.pertussis antigenic fractions on heterochromatin structure of interphase nuclei of buccal epithelium.

Obtaining the native antigen was carried out by ultrasound disintegration in different frequency ranges of Bordetella pertussis industrial strains № 267 and № 475: the low-frequency (frequency of 60 kHz, power of 5 W), medium-frequency (frequency of 130 kHz, power of 9 W), high-frequency (frequency 1,6 MHz, power of 3 W), followed by desintegrate centrifugation (18000g), filtration, concentration and fractionation of antigenic complex into separate fractions by gel - chromatography.

Assessment of the heterochromatin stability in the buccal epithelium of nuclei cells after adding each individual B.pertussis antigen was performed as follows. We got buccal epithelium from the inner surface of the healthy adult human cheek and placed it to the buffer solution. We added experimental preparations (1: 1 by volume) to epithelial cell suspension and physiological solution of sodium chloride to the control sample. We kept it for 4 hours, then made preparations on a slide and tinted with 2% orcein for 30-60 minutes. Under the light microscope we counted the number of heterochromatin granulas in 30 epithelial cell nuclei.

Evaluation of heterochromatin stability in interphase nuclei of buccal epithelium during applying pertussis antigen microbes extracted in different frequency ranges of ultrasound (low - 60 kHz, average - 130 kHz, high - 1.6 MHz) showed growth of figures in all experimental groups comparatively to control values. There was not found reliable difference in the amount of heterochromatin in the nuclei of buccal epithelium cells after adding purified antigens with molecular weight ≥ 1000 kDa and ~ 3.0 kDa between each other (all frequency ranges of ultrasound). Reliable increase in the number of heterochromatin comparatively to other fractions was seen after interaction of buccal epithelium with cell-free preparations of molecular weight ~ 8.1 kDa obtained in the medium frequency range of ultrasound (130 kHz).

This method is sensitive to adding the antigen and can be used as an additional test for evaluating the harmfulness of candidate drugs of pertussis vaccine.

Key words: buccal epithelium, heterochromatin, antigens, Bordetella pertussis, animal.

Corresponding author: *isaenko.elena@list.ru

Резюме

Ісаєнко О.Ю.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України»

Пушкинська 14/16,

Харків, 61057, Україна

ВИВЧЕННЯ СТАНУ ГЕТЕРОХРОМАТИНУ В ЯДРАХ КЛІТИН БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ПІСЛЯ НАВАНТАЖЕННЯ АНТИГЕНАМИ V.PERTUSSIS, ОТРИМАНИМИ В РІЗНИХ ЧАСТОТНИХ ДІАПАЗОНАХ УЛЬТРАЗВУКУ

Проведено вивчення показників стану гетерохроматину в інтерфазних ядрах клітин букального епітелію після навантаження антигенами V.pertussis. Оцінка стабільності гетерохроматину в інтерфазних ядрах клітин букального епітелію під час застосування антигенів кашлюкового мікробу, виділених в різних частотних діапазонах ультразвуку (низькі - 60 кГц, середні - 130 кГц, високі - 1,6 мГц) показала збільшення показників всіх дослідних груп відносно контрольних значень. Достовірної різниці показників кількості гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію після навантаження очищеними антигенами з молекулярними масами ≥ 1000 кДа та $\sim 3,0$ кДа між собою (всі частотні діапазони ультразвуку) не встановлено. Достовірне збільшення кількості гетерохроматину спостерігалось після взаємодії букального епітелію з безклітинними препаратами з молекулярною масою $\sim 8,1$ кДа, отриманими в середньочастотному діапазоні ультразвуку (130 кГц) відносно інших фракцій. Даний метод чутливий до антигенних навантажень та може бути використано в якості додаткового тесту при оцінці шкідливості кашлюкових вакцинних препаратів-кандидатів.

Ключові слова: букальний епітелій, гетерохроматин, антигени, Bordetella pertussis, тварини.

Резюме

Ісаєнко Е.Ю.

ГУ «Инсмикробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАМН Украины»

Пушкинская 14/16,

Харков, 61057, Украина

ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ЯДРАХ КЛЕТОК БУКАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПОСЛЕ НАГРУЗКИ АНТИГЕНАМИ V.PERTUSSIS, ПОЛУЧЕННЫМИ В РАЗНЫХ ЧАСТОТНЫХ ДИАПАЗОНАХ УЛЬТРАЗВУКА

Проведено изучение показателей состояния гетерохроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия после нагрузки антигенами V.pertussis. Оценка стабильности гетерохроматина в интерфазных ядрах клеток буккального эпителия при применении (во время использования) антигенов коклюшного микроба, выделенных в разных частотных диапазонах ультразвука (низкие - 60 кГц, средние - 130 кГц, высокие - 1,6 мГц) показала увеличение показателей всех опытных групп относительно контрольных значений. Достоверной разницы показателей количества гетерохроматина в ядрах клеток буккального эпителия после нагрузки очищенными антигенами с молекулярными массами ≥ 1000 кДа и $\sim 3,0$ кДа между собой (все частотные диапазоны ультразвука) не установлено. Достоверное увеличение количества гетерохроматина наблюда-



лось после взаимодействия буккального эпителия с бесклеточными препаратами с молекулярной массой ~ 8,1 кДа, полученными в среднечастотном диапазоне ультразвука (130 кГц) относительно других фракций. Данный метод чувствителен к антигенным нагрузкам и может быть использован в качестве дополнительного теста при оценке вредности коклюшных вакцинных препаратов-кандидатов.

Ключевые слова: буккальный эпителий, гетерохроматин, антигены, Bordetella pertussis, животные.

Автор, відповідальний за листування: *isaenko.elena@list.ru

Вступ

Протягом всієї історії науки в досліджах використовують тварин. На сьогоднішній день згідно даних [«British Union for the Abolition of Vivisection \(BUAV\)»](#) та «Nuffield Council on Bioethics», кожний рік в світі понад 100 мільйонів тварин задіяне в експериментах [1]. За даними Європейського Союзу (ЄС) в Європі фармацевтичні компанії кожнорічно в досліджах використовують близько мільйона тварин без застосування анестезії, оскільки їх сумісна взаємодія може відзначитися на результатах експерименту, при цьому наносячи значну шкоду самим тваринам [4]. До 1989 року ветеринарам США рекомендувалось зовсім не звертати уваги на біль піддослідних тварин [3]. За даними Департаменту сільського господарства США у 2006 році близько 670 000 піддослідних тварин - це 57 % (без врахування щурів, мишей, птах та безхребетних) заподіювали більш ніж миттєву біль; 36 % (420 000 тварин) відчували біль з використанням обезболювання, а 84 000 тварин - 7 % витримували біль без додаткового обезболювання [4]. При цьому, ще в 1655 році [Едмунд О'міру](#) зазначав, що фізіологія тварин залежить від болю, яка робить результати експерименту недостовірними [2]. Сьогодні його припущення цілком підтверджено: лікарські засоби, які по результатам тестів на тваринах були сертифіковані як нешкідливі, у людей викликали побічні явища та смерть, наприклад тільки в США гине 100 000 людей кожний рік завдяки реакціям на препарати [1].

Доктор Ralph Neuwold, колишній науковий керівник Хантінгдонського науково-дослідницького центру в Великобританії, який для дослідів використовував тварин у великій кількості зазначив, що при визначенні токсичності кореляція побічних реакцій між людьми та тваринами знаходиться в діапазоні 5 - 25 %, тобто дослідження на тваринах дозволяють виявити максимум одне із чотирьох побічних

явищ, які згодом з'являться у людини [1]. Згідно інших даних вивчення на тваринах виявляють 1% побічних реакцій, оскільки у них неможливо простежити найбільш поширені симптоми (нудоту, запаморочення, головні болі, порушення зору) та спрогнозувати довгочасові побічні явища, оскільки життя лабораторних тварин в середньому до 66 раз менше ніж у людей [1].

У ХХ сторіччі спочатку в США (після «Елік-сир сульфаніламідної» трагедії 1937 року коли загинуло понад 100 людей), пізніше в інших країнах ввели закони, згідно яких необхідно обов'язково вивчати токсичність лікарських засобів на тваринах. На сьогоднішній день всі препарати без виключення перед ліцензуванням та тестуванням на людях проходять суворі випробування на тваринах. В 2005 році в світі третя частина тестів токсичності визначалась розрахунком ЛД₅₀ - це доза, яка викликає загибель 50 % піддослідних тварин, хоча з 2002 р. в міжнародних принципах «Організація економічної співпраці та розвитку» даний тест було замінено на процедури з фіксованою дозою, які потребують меншої кількості тварин та викликають менше страждань.

Серед тестів на токсичність виділяють: гостру (збільшення дози до появи видимих ознак токсичності - європейське законодавство потребує проведення тестів мінімум на 2 видах ссавців різних отрядів мінімум двома способами введення), хронічну (можуть проводитися впродовж двох років та згідно ЄС необхідно використання не менш двох видів ссавців, один із яких не [гризун](#)), підгостру (введення препарату впродовж 4-6 тижнів в дозах, які не викликають швидкого отруєння для визначення спроможності створення токсичних метаболітів згодом).

Ще в 1959 році Расселом (Russell) та Берчем (Burch) була запропонована концепція «3R» (Replacement, Reduction, Refinement - заміна, скорочення, удосконалення), що означає: «refinement» - поліпшення вимог утримування



та поводження з тваринами; «reduction» — зменшення їх кількості; «replacement» — заміна високоорганізованих тварин низькоорганізованими та використання альтернативних методів [6]. Концепція «3R» явно не згадується в європейському законодавстві, але її принципи включено до статті 7, параграфу 2-4 Директиви Європейського Економічного Співтовариства 86/609/ЄЕС (1986) [1]. У вересні 2010 року Європейським парламентом було прийнято нову директиву 2010/63/ЄС, яка замінила попередню 86/609/ЄЕС.

Приймаючи до уваги концепцію Директиви 2010/63/ЄС, положення Гельсінкської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (2000 р.), рекомендації 1985 р. етичного кодексу розділу «Міжнародні рекомендації по проведенню медико-біологічних досліджень з використанням тварин», Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, прийнятий у 2006 році, де затверджене небажане застосування тварин для наукових цілей й необхідність заміни їх альтернативними методами, а також недостовірність побічних реакцій між людьми та тваринами пріоритетна увага приділяється методам контролю біопрепаратів без використання лабораторних тварин: тестуванню на тканинних та клітинних культурах бактерій, математичному моделюванню, комп'ютерним технологіям та ін. [1, 5-6].

В останні роки в багатьох наукових дослідженнях вагомий інтерес приділяють мукозальному епітелію (епітелію слизових оболонок), зокрема букальному епітелію. Існують літературні дані о змінах функціональної активності клітин букального епітелію під впливом ряду факторів: фізичних навантажень, токсичних речовин, патологічному процесі та іншому [7-9]. Збільшення адгезивних реакцій букальних клітин та мікроорганізмів (найчастіше вивчення проводили з *C. albicans*) відзначалось у дітей хворих на бронхіальну астму, у людей інфікованих вірусом імунодефіциту людини, хворих на цукровий діабет, при хіміорадіотерапії злоякісних пухлин, у період гормональних перебудов організму, у палящих людей [10]. Послаблення адгезії *C. albicans* на букальних клітинах спостерігалось після тривалого прийому аскорбінової кислоти, відразу після народження, після тижневого лікування флюконазолом [10].

Враховуючи вищезазначене, передбачаємо, що ядерний матеріал клітин букального епітелію повинен реагувати на процеси прилипання

антигенів до поверхневих рецепторів епітелію. Адгезія антигенів впливає на активність транспорту води всередину клітини, змінює інтенсивність окислювально-відновлених процесів, що повинно відзначитися на стабільності геному клітин. Показником таких змін може бути хроматин.

В проведеній нами серії експериментів передбачалось, що лігандно-рецепторна взаємодія між антигенами збудника кашлюку та епітеліальними клітинами може позначитися на функціональній активності тест-клітин, найти відгук в структурі хроматину ядра, що дозволить використовувати даний метод в якості додаткового тесту в оцінці шкідливості кашлюкових вакцинних препаратів-кандидатів.

Мета. Вивчення впливу антигенних фракцій *B.pertussis* на структуру гетерохроматину інтерфазних ядер клітин букального епітелію.

Дослідження проведено у рамках НДР «Біологічна характеристика антигенів збудників дифтерії, кашлюку та туберкульозу, виділених за допомогою фізико-хімічних методів», № держреєстрації 0108U001295.

Матеріали та методи досліджень.

Отримання нативних антигенів здійснювалось за допомогою ультразвукової дезінтеграції в різних частотних діапазонах промислових штамів *Bordetella pertussis* № 267 та № 475. Мікробну завісь з оптичною щільністю 1,0 McFarland (прилад Densi-La-Meter) руйнували на низькочастотному генераторі ГЗ – 109 (частота – 60 кГц, потужність – 5 Вт, експозиція – 7 годин), на середньочастотному приладі ТУ 3468-001-42369179-03 (частота 130 кГц, потужність 9 Вт, експозиція – 5 годин) та високочастотному генераторі УД-1 (частота 1,6 МГц, потужність 3 Вт, експозиція – 1 година). Мікробні ультразвукові дезінтеграти центрифугували (18 000 g, температура 4 - 5⁰ С) впродовж 1 години, фільтрували скрізь мембрани «Владіпор» МФАС – Б №4 з діаметром пор 0,2 μm), концентрували випарюванням та фракціонували антигенний комплекс на окремі антигени за допомогою гель-хроматографії.

Отриманий антигенний препарат складався із субодиниць з молекулярними масами, розташованими в діапазоні від <1 кДа до 1000 кДа та вище. В даній роботі представлені наступні фракції: УФА – з молекулярними масами ≥ 1000 кДа, УФВ – з молекулярними масами ~ 8,1 кДа, УФС – з молекулярними масами ~ 3,0 кДа.



Оцінку стабільності гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію після навантаження кожним окремим антигеном *B.pertussis* проводили згідно методики [7, 11 - 12]. Для цього з внутрішньої поверхні щоки дорослої здорової людини отримували букальний епітелій, який поміщали в буферний розчин. В суспензію клітин епітелію додавали дослідні препарати (1:1 по об'єму), а до контрольної проби – фізіологічний розчин натрію хлориду. Витримували 4 години, після чого готували препарати на предметному склі та підфарбовували 2% орсеїном протягом 30-60 хвилин. Під світловим мікроскопом підраховували кількість гранул гетерохроматину в 30 ядрах епітеліальних клітин. Дослід повторювали тричі.

Оцінювали отримані данні з визначенням середнього значення (M) та його стандартного

відхилення ($\pm m$). Достовірність різниць між групами визначали за допомогою критерію Стьюдента. Статистичну обробку результатів експерименту проводили, використовуючи програмні пакети Microsoft Excel 2003 та "Biostat-4".

Результати досліджень та їх обговорення.

Вивчення впливу трьох антигенних фракцій збудника кашлюку показало зміни функціональної активності клітин букального епітелію після дії зазначених подразників (Table 1). Проведений аналіз оцінки стабільності гетерохроматину в інтерфазних ядрах клітин букального епітелію виявив збільшення показників всіх дослідних груп відносно контрольних значень, які становили $8,5 \pm 0,1$.

Table 1.

Кількість гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію після навантаження антигенами *B.pertussis*.

частотний діапазон ультразвуку	середні показники по трьом дослідям, (M \pm m)		
	антигенні препарати		
	УФА (≥ 1000 кДа)	УФВ ($\sim 8,1$ кДа)	УФС (\sim кДа)
60 кГц	9,4 \pm 0,2*	9,6 \pm 0,1*	9,3 \pm 0,2*
130 кГц	9,2 \pm 0,2*	9,8 \pm 0,1*	9,2 \pm 0,1*
1,6 мГц	9,3 \pm 0,2*	9,6 \pm 0,1*	9,3 \pm 0,2*
контроль		8,5 \pm 0,1	

Примітка. * - різниця достовірна відносно контролю, (P<0,05).

Проведення кількісної оцінки дозволило отримати індивідуальні коливання кількості гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію після використання різних кашлюкових антигенів. В процесі досліджень максимальні значення (в порівнянні з контролем) спостерігались після навантаження препаратом УФВ незалежно від частотного діапазону ультразвуку (низькі - 60 кГц, середні - 130 кГц, високі - 1,6 мГц). Кількість гетерохроматину в ядрах клітин становила в межах 9,6 – 9,8 (P<0,05). Кашлюкові антигени УФА характеризувались меншим зростанням зазначених показників при всіх ультразвукових режимах, вони становили 9,2 – 9,4 (P<0,05 відносно контролю). Самі нижчі значення спостерігались після застосування низькомолекулярних фракцій УФС, їх параметри коливались між 9,2 – 9,3.

При співставленні показників гетерохроматину в інтерфазних ядрах клітин букального

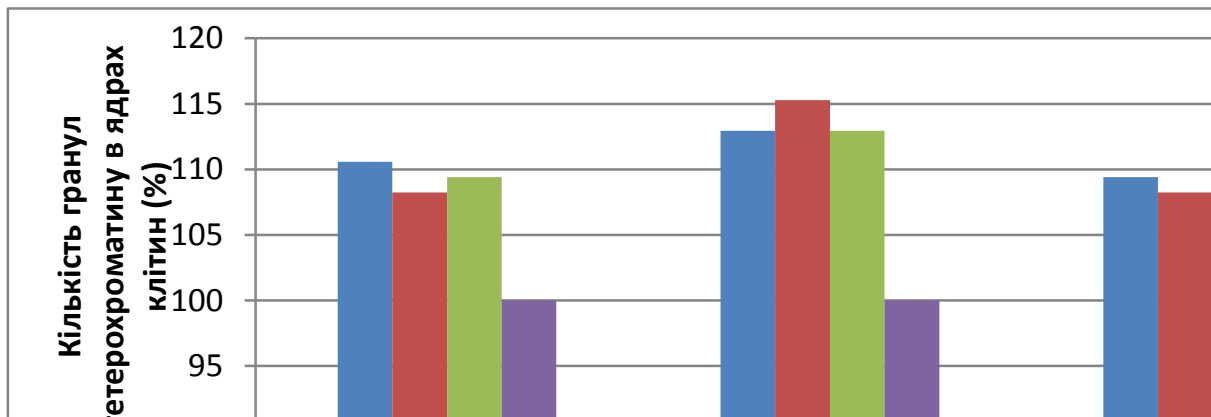
епітелію після навантаження очищеними антигенами *B.pertussis* виявилось, що збільшення кількості гетерохроматину після взаємодії з фракціями УФВ, виділеними при застосуванні низько- та високочастотних ультразвукових хвиль, відносно фракцій УФА та УФС недостовірно. Достовірні результати зміни кількості гетерохроматину поміж препаратами УФВ с УФА та УФС спостерігались при отриманні їх у середньочастотному діапазоні ультразвуку.

Відсоткова оцінка даних параметрів відносно контрольної групи більш наглядно показала виниклі зміни (Мал.1). Проведена відсоткова характеристика препаратів УФА, УФС показала майже однакові показники кількості гетерохроматину, як поміж собою, так і при опроміненні різними ультразвуковими чинниками (низькочастотні, середньочастотні та високочастотні). При застосуванні антигену УФВ зазначена тенденція не спостерігається. При порівнянні від-



соткових значень фракції УФВ з іншими антигенами достовірні зміни відбувалися тільки при

використанні для дезінтеграції середньочастотного чинника.



Мал.1. Оцінка стабільності гетерохроматину в ядрах клітин букального епітелію після навантаження антигенами *B.pertussis* у відсотках.

Зміни кількості гетерохроматину в інтерфазних ядрах клітин букального епітелію доводять чутливість даного методу до навантажень анти-

генами, що може служити додатковим показником при оцінці шкідливості кашлюкових вакцинних препаратів.

Висновки

1. Простежена тенденція збільшення кількості гетерохроматину в інтерфазних ядрах клітин букального епітелію всіх дослідних груп відносно контрольних значень після навантаження ультразвуковими антигенами УФА, УФВ, УФС (≥ 1000 кДа, $\sim 8,1$ кДа та $\sim 3,0$ кДа).
2. Достовірне збільшення кількості гетерохроматину відносно інших фракцій спостері-

галось після взаємодії букального епітелію з безклітинними препаратами УФВ ($\sim 8,1$ кДа), отриманими в середньочастотному діапазоні ультразвуку (130 кГц).

3. Даний метод чутливий до низьких антигенних навантажень та може бути використан в якості додаткового тесту в оцінці шкідливості кашлюкових вакцинних препаратів-кандидатів.

References (список літератури)

1. [Provedenie opytov na zhyvotnykh]. *Animal Experimentation*. Retrieved from: http://www.animalmosaic.org/Images/Animal%20Experimentation_Russian_tcm46-28242.
2. Vaughan Monamy *Animal Experimentation: A Student Guide to Balancing the Issues*. Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching. English 1996: 56 p.
3. Bernard ER [Animal Rights and Human Morality]. *Prometheus Books*. English, 2006.400 p.
4. [2005 Report on Enforcement of the Animal Welfare Act], *U.S. Department of Agriculture*. Retrieved from: <http://www.all-creatures.org/saen/articles-2005enf-c.html>.
5. Reznikov A H. [Bioetycheskyie aspekty eksperimentov na zhyvotnykh]. *Klinichna khirurgiia*. 2010;6:8 – 13.
6. Hajime Kojima JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new

alternatives to animal testing. *World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*. Tokyo, Japan. 2007:august 21-25. Retrieved from: <http://altweb.jhsph.edu/wc6/paper483.pdf>.

7. Shkorbatov YuG, Sutiusev TA, Rolupaeva TV [Izmieneniie sostoianiiia khromatina i eliektrotritsatielnosti iadier kletok bukkalnoho epiteliiia pri fizicheskikh nahruzkhakh u donorov raznogo vozrastay]. *Biologicheskie mekhanizmy starieniia: materialy VII simpoziuma*. Kharkiv, 2006, pp. 32–34. (In Ukrainian).
8. Cheshun VF [Kilkist mikroiadier i osoblyvosti struktury khromatinu v kletynach bukkalnoho epiteliiia ta riven gomotsysteinu u plazmi krovi zhinok z puchlynamy molochnoi zalozy]. *Onkologiia*. 2011;9(4):311-315.
9. Maianskii AN, Zaslavskaia MI, Zielienova Ieg [Adezhivnyie reaktsii bukkalnyh epiteliiotsytov v indikatsii narusheniia miestnogo i obshchego

- gomeostaza]. *Nizhegorodskii meditsinzkyi zhurnal*. 2005;1:158–161.
10. Abadzhydi MA, Machrova TV, Maianskii MI, Zaslavskaia YuYu, Maianskii AN [Bukkalnyh epiteliosyty kak instrument kliniko-laboratornykh issledovani]. Retrieved from: <http://www.medicum.nnov.ru/nmj/2003/3-4/23.php>
11. Shachbazov VG, Kolupaeva TV, Nabokov AL [Novyi metod opredeleniia biologiceskogo
- vozrasta cheloveka]. *Laboratornoe delo*. 1986;7:404-406.
12. Shkorbatov YuG, Shachbazov VG [Elietrokineticheskie svoistva kletochnykh iadier: sviaz s sostoianiem kletki i organizma]. *Trudy po fundamentalnoi i prikladnoi genetiki*. Kharkiv, 2003(2), pp. 71–92. (In Ukrainian).

(received 30.04.2015, published online 30.06.2015)

(отримано 30.04.2015, опубліковано 30.06.2015)

