

УДК: 595.143:577.29:612.014

**О.К. Фролов<sup>1</sup>, Р.О. Литвиненко<sup>1</sup>, О.Л. Ребець<sup>2</sup>, І.С. Юрчук<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ДВНЗ «Запорізький національний університет» Міністерства освіти і науки України,  
вул. Жуковського, буд. 66, Запоріжжя, МСП-41, 69600, Україна

<sup>2</sup>ДУ «Запорізький обласний лабораторний центр держсанепідслужби України»,  
вул. Рекордна, буд. 27, Запоріжжя, 69037, Україна

## **ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *ESCHERICHIA COLI* 3912/41**

**Мета.** З'ясувати вплив екзогенних біологічно активних речовин культуральної води, де утримувалися медичні п'явки, на біологічні властивості *Escherichia coli* 3912/41. **Методи.** Готували м'ясо-пептонний агар (МПА) з різною концентрацією культуральної води, де утримувалися медичні п'явки: 0, 0,1, 1, 5, 10, 15%. На поверхню МПА з культуральною водою відповідної концентрації (дослід) та без неї (контроль) вносили робочу суспензію добової культури бактерій *E. coli* 3912/41 з концентрацією клітин 850 КУО/мл. Досліджували культуральні та морфологічні властивості *E. coli*. Зміну антигенних властивостей вивчали в реакції слайд-аглотинації з сироваткою діагностичною ешерихіозною ОКА полівалентною сухою для реакції аглотинації. **Результати.** Виявили пригнічення культуральних властивостей *E. coli*, яке характеризувалося зменшенням колоній починаючи з 1% вмісту культуральної води, де утримувалися медичні п'явки в МПА. При мікроскопічному аналізі виявлено бактерії зі зменшенням розмірів до кокоподібної форми. Зі збільшенням концентрації культуральної води в МПА виявлено порушення видових антигенних властивостей *E. coli*. **Висновки.** Культуральна вода, де утримувались медичні п'явки, залежно від концентрації в МПА пригнічує культуральні та антигенні властивості *E. coli*. Одержані результати вказують на перспективу використання культуральної води, де утримувалися медичні п'явки, як джерело біологічно активних речовин з бактеріостатичною дією на умовно патогенні бактерії.

*Ключові слова:* *Escherichia coli*, біологічно активні речовини, медична п'явка, культуральна вода, бактеріостатичний ефект.

Організм медичної п'явки *Hirudo verbana*, Carena, 1820 (МП) продукує комплекс унікальних біологічно активних речовин (БАР) – гірудин, егліни, бделіни, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та інші, які проявляють широкий спектр терапевтичних ефектів [2, 3, 4]. Окрім того, доведено, що екстракт слини МП проявляє бактеріостатичну дію, аналогічну до антибіотиків, але без побічних ефектів. У виробленні БАР слини МП бере участь бактерія-ендосимбіонт – *Aeromonas hydrophila* [4, 11, 14]. Тому при гірудотерапії відсутні первинні бактеріальні ускладнення [3, 4]. При культивуванні МП її БАР виділяються у водне середовище (культуральна вода),

© О.К. Фролов, Р.О. Литвиненко, О.Л. Ребець, І.С. Юрчук, 2014



в якому вони містяться разом із іншими продуктами життєдіяльності: екскременти, сеча, слиз та злучені залишки кутикули [4, 11]. Природно припустити, що більшість біологічних властивостей БАР, в тому числі бактеріостатичні, зберігаються і в культуральній воді. **На дане припущення вказує емпіричне застосування гірудотерапевтами останньої при запальних захворюваннях шкіри та слизових оболонок [3].**

Тому метою роботи було з'ясування впливу екзогенних БАР культуральної води з-під МП на біологічні властивості *Escherichia coli* 3912/41.

### **Матеріали та методи досліджень**

Об'єктами дослідження були: екзогенні БАР культуральної води, де утримувалися МП, та штам *E. coli* 3912/41 (0-55 К 59), отриманий із бактеріологічної лабораторії міської санітарно-епідеміологічної станції м. Запоріжжя. Стерильну культуральну воду для дослідження готували з 2 л. культуральної води, отриманої при культивуванні 35–40 товарних МП середнього віку протягом 3 діб, які до цього голодували не менше 4 місяців. З метою усунення зважених речовин воду фільтрували через паперовий фільтр, центрифугували у рефрижераторній центрифугі при 4 °С, 200 g 20 хв. В отриманій культуральній воді, де утримувалися МП, визначали вміст сухого залишку (ГОСТ 18164-72), який складав 275,36 мг/дм<sup>3</sup>, тоді як в дехлорованій шляхом відстоювання водогінній воді, яку використовують при культивуванні МП – 240,36 мг/дм<sup>3</sup>. Насад культуральної води отриманий після центрифугування стерилізували шляхом фільтрування за допомогою бактеріальної насадки з діаметром пор 0,23 мкм. Фільтрат перевіряли на стерильність та додавали до м'ясо-пептонного агару (МПА), охолодженого до 45 °С у концентрації: 0, 0,1, 1, 5, 10, 15%.

Із добової культури бактерій штаму *E. coli* 3912/41 готували суспензію у концентрації 850 млн/мл мікробних клітин. З цієї суспензії готували послідовні десятикратні розведення у фізіологічному розчині, використовували робоче розведення 10<sup>-5</sup> КУО/мл. На поверхню МПА з культуральною водою відповідної концентрації (дослід) та без неї (контроль) наносили по 0,1 мл робочої суспензії добової культури бактерій *E. coli* та культивували 24 год при 37 °С.

У бактерій, що виростили на МПА з культуральною водою з-під МП вивчали морфологію, забарвлення за Грамом та антигенні властивості (реакція слайд-аглоїтинації) [1, 5, 7, 9, 10].

При відхиленні дослідного мікроорганізму навіть за однією ознакою від контрольного, його відносили до аномального. Загальну кількість аномальних морфологічних форм бактерій визначали у відсотках.

Зміни антигенної структури досліджуваного штаму *E. coli* виявляли в реакції слайд-аглоїтинації [1, 5] з сироваткою діагностичною ешерихіозною ОКА полівалентною сухою для реакції аглоїтинації (серія № 201, ВАТ «Біомед» ім. І.І. Мечникова, Російська Федерація). В досліді використовували 10 бактеріальних колоній. Наявність аглоїтинації позначали як одиницю, а відсутність – як нуль.



Всі дослідження проводили не менше, ніж в трьох повторах (n), кількість паралельних визначень в експериментах становила не менше трьох. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням пакету прикладних програм IBM SPSS Statistics 20,0. Середнє арифметичне вибірки ( $x_{cp}$ ) і стандартну похибку (m) розраховували для кожного дослідження. Визначали коефіцієнт кореляції за Пірсоном ( $r_{xy}$ ) між досліджуванним показником та впливом культуральної води, де утримувалися МП, різної концентрації. Статистично значимими вважали зміни при  $p \leq 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Результати дослідження впливу екзогенних БАР МП на біологічні властивості *E. coli* представлені в таблиці.

Таблиця

#### Вплив екзогенних БАР культуральної води різної концентрації з-під МП на біологічні властивості *E. coli* ( $x_{cp} \pm m$ )

Table

#### Influence of the exogenous BAS from cultural water of medicinal leeches in different concentrations on biological properties of *E. coli* ( $x_{cp} \pm m$ )

Показник	Кількість визначень, n	Вміст культуральної води в МПА, %					
		0	0,1	1	5	10	15
Життєздатність на МПА, КУО/мл	3	851,3 ±7,06	850,3 ±6,12	798,7 ±6,36	638,0 ±4,16	532,3 ±3,84	398,0 ±3,06
Аномальні форми, %	3	0,0± 0,00	0,0± 0,00	11,0± 1,73	41,0± 2,52	68,0± 4,36	84,0± 3,61
Антигенні властивості, бали	10	1,0± 0,00	1,0± 0,00	0,8± 0,13	0,6± 0,16	0,1± 0,10	0,0± 0,00

При посіві на МПА в контрольних зразках культури утворювали типові плоскі, напівпрозорі, блискучі, випуклі з білувато-жовтим відтінком S-колонії з рівними чи злегка хвилястими краями 3–5 мм в діаметрі, тобто *E. coli* мали типову для ентеробактерій форму [1, 5].

Пригнічення життєздатності *E. coli* на МПА з культуральною водою, де утримувалися МП, порівняно з контролем, відмічалось уже при 5%. Встановлено сильний негативний кореляційний зв'язок між концентраціями культуральної води та життєздатністю *E. coli* на МПА ( $r_{xy} = -0,99 \pm 0,001$ ,  $n=3$ ,  $p \leq 0,05$ ). З підвищенням концентрації культуральної води у МПА спостерігається більш виражена бактеріостатична дія. При аналізі життєздатності і морфології колоній *E. coli* на МПА виявили ознаки пригнічення життєздатності бактерій під дією екзогенних БАР культуральної води, де утримувалися МП, які проявлялися затримкою росту, появою дрібних колоній на чашках Петрі.

Аналіз морфології бактерій за розміром та забарвленням за Грамом показав, що у дослідних культурах клітини бактерій *E. coli* змінюють форму. Клітини



вкорочуються до овальної та кокоподібної форми. Як свідчать результати наведені у таблиці, аномальні форми мікробних тіл зустрічалися в культурах уже за 1% вмісту культуральної п'явочної води. При 5% – відхилення у морфології мікробів зустрічалися майже у половини мікробних тіл, а при 10% – перевищувало половину, при 15% вмісту аномальні форми складала переважну більшість.

Аномальна морфологія бактеріальних клітин, імовірно, є наслідком порушення метаболізму в мікробній клітині [1], що позначилося на культуральних властивостях *E. coli* – зменшення розмірів мікробних колоній, поява їх дрібних форм на МПА. Виявлені високі позитивні кореляційні зв'язки між концентрацією культуральної води та аномальними морфологічними формами бактеріальних клітин, підкреслюють наявність бактеріостатичної дії екзогенних БАР МП ( $r_{xy} = +0,98 \pm 0,01$ ,  $n=3$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Оскільки зміни культуральних та морфологічних властивостей *E. coli* під впливом культуральної води зумовлені порушенням їх метаболізму, вони також можуть супроводжуватися змінами антигенної структури бактерій. Це припущення було підтверджене в реакції слайд-аглютинації, яку ставили з використанням сироватки діагностичної ешерихіозної ОКА полівалентної, яка містить антитіла до О і К антигенів більше 20 основних серологічних груп *E. coli*, які циркулюють серед населення України [1, 5].

Втрата антигенних властивостей *E. coli* відмічалася починаючи з 1% концентрації культуральної води, де утримувалися МП, більш помітною була при 5%, майже повна зміна антигенних властивостей відмічалась при 10%. Кореляційний аналіз щодо наявності взаємозв'язку між впливом екзогенних БАР культуральної води, де утримувалися МП, різної концентрації та антигенними властивостями *E. coli* в реакції слайд-аглютинації, показує наявність сильного негативного зв'язку ( $r_{xy} = -0,81 \pm 0,04$ ,  $n=10$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Можна припустити, що отримані нами дані щодо змін мікроскопічних ознак росту *E. coli* на МПА показують, що екзогенні БАР культуральної води, де утримувалися МП, мають виражену бактеріостатичну дію, подібну до антибіотиків, до яких чутлива *E. coli* на основі літературних даних, представлених нижче. Так, встановлено [11], що культуральна вода МП містить білки сироватки крові годувальника п'явки – альбуміни і глобуліни, а також гірудин, гіалуронідазу, тригліцерідазу, еластазу, апіразу, амінокислоти (в найбільших концентраціях: триптофан, глютамінова кислота, аланін, лізин, лейцин) та біогенні елементи – калій, натрій, фосфор і мікроелементи (селен, йод, бром, сірка). Як відомо, гіалуронідаза та колагеназа виконують бактерицидну та бактеріостатичну дію [6]. Можливо, води оброблені МП також містять антибіотик (хлороміцетин), який виділяє МП [12]. В народній медицині, ветеринарії використовують культуральну воду, де утримувалися МП, для лікування запальних процесів, шлунково-кишкових захворювань, дерматологічних захворювань [цит. по 11]. При обробці бактерій *E. coli* антибіотиками, а також при проходженні курсу антибіотикотерапії, бактеріальні клітини вкорочуються, а колонії на МПА зменшуються в діаметрі та ущільнюються [8, 13]. При цьому автори зазначають, що ці морфологічні прояви можуть відбуватися як результат пригнічення синтезу



клітинної стінки, білка чи РНК, реплікації ДНК або функціонування мембран, залежно від того, що є первинним механізмом дії антибіотика.

Отже, культуральна вода МП пригнічує ріст та життєздатність *E. coli* на МПА, що проявляється затримкою росту, появою дрібних колоній, перехідних морфологічних форм, укороченням розміру бактеріальних клітин. Зміни серологічних ознак *E. coli* під дією екзогенних БАР культуральної води, де утримувалися МП, у реакції слайд-аглотинації, пов'язані зі зміною структури її аглютинаційного антигенного комплексу. Таким чином, одержані результати вказують на перспективу використання культуральної води, отриманої при біотехнології МП, як джерела БАР із бактеріостатичною дією щодо умовно-патогенних штамів бактерій, зокрема *E. coli*.

Таким чином, культуральна вода, отримана при вирощуванні медичної п'явки, містить БАР, які пригнічують життєздатність *E. coli*, порушують нормальну морфологію клітин та антигенні властивості їх оболонки.

А.К. Фролов<sup>1</sup>, Р.А. Литвиненко<sup>1</sup>, О.Л. Ребець<sup>2</sup>, І.С. Юрчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГВУЗ «Запорожский национальный университет»,  
ул. Жуковского, д. 66, Запорожье, ГСП-41, 69600, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Запорожский областной лабораторный центр госсанэпидслужбы Украины»,  
ул. Рекордная, д. 27, Запорожье, 69037, Украина

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *ESCHERICHIA COLI* 3912/41

### Реферат

**Цель.** Выяснить влияние экзогенных биологически активных веществ культуральной воды, где содержались медицинские пиявки, на биологические свойства *Escherichia coli* 3912/41. **Методы.** Готовили мясо-пептонный агар (МПА) с различной концентрацией культуральной воды, где содержались медицинские пиявки: 0, 0,1, 1, 5, 10, 15%. На поверхность МПА с культуральной водой соответствующей концентрации (опыт) и без нее (контроль) вносили рабочую суспензию суточной культуры бактерий *E. coli* 3912/41 с концентрацией клеток 850 КОЕ/мл. Исследовали культуральные и морфологические свойства *E. coli*. Изменение антигенных свойств изучали в реакции слайд-аглотинации с сывороткой диагностической ешерихиозной ОКА поливалентной сухой для реакции аглотинации. **Результаты.** Обнаружили угнетение культуральных свойств *E. coli*, которое характеризовалось уменьшением колоний начиная с 1% содержания культуральной воды, где содержались медицинские пиявки, в МПА. При микроскопическом анализе обнаружены бактерии с уменьшением размеров до коккообразной формы. С увеличением концентрации культуральной воды в МПА выявлены нарушения видовых антигенных свойств *E. coli*. **Выводы.** Культуральная вода, где содержались медицинские пиявки, в зависимости от концентрации





*в МПА подавляет культуральные и антигенные свойства E. coli. Полученные результаты указывают на перспективу использования культуральной воды, где содержались медицинские пиявки, как источник биологически активных веществ с бактериостатическим действием на условно патогенные бактерии.*

*Ключевые слова: Escherichia coli, биологически активные вещества, медицинская пиявка, культуральная вода, бактериостатический эффект.*

**O.K. Frolov<sup>1</sup>, R.O. Litvinenko<sup>1</sup>, O.L. Rebets<sup>2</sup>, I.S. Yurchuk<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>SHEE «Zaporizhzhia National University»,  
66, Zhukovsky str, Zaporizhzhia, 69600, Ukraine

<sup>2</sup>SI «Zaporizhzhia Regional Laboratory Center of State Epidemiological Service Ukraine»,  
27, Recordna str, Zaporizhzhia, 69037, Ukraine

## **INFLUENCE OF MEDICAL LEECH'S EXOGENIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* 3912/41**

### **Summary**

**Purpose.** *To ascertain the effect of exogenous bioactive substances of cultural water, which contained the medicinal leeches on biological properties of Escherichia coli 3912/41. **Methods.** There were prepared the meat-peptone agar (MPA) with various concentrations of the cultural water, which contained the medical leech: 0, 0.1, 1, 5, 10, 15%. On the surface of the MPA with appropriate concentration of cultural water (experiment) and without (control) there were added daily working suspension culture of bacteria E. coli 3912/41 cells at the concentration of 850 CFU/ml. The cultural and morphological properties of E. coli were investigated. Change of the antigenic properties of the reaction was studied in slide agglutination with serum diagnostic polyvalent dry to OKA-antigens of Escherichia for agglutination reaction. **Results.** There were found the cultural properties oppression of E. coli, characterized by the decrease in the colonies from 1% water content of the culture, which contained medicinal leeches in MPA. At microscopic analysis there were detected the bacteria reduction in size to coccus-like forms of bacteria. The antigenic properties of species E. coli infringements with increasing concentration of the cultural water in MPA were found. **Conclusions.** The cultural water, which contained the medical leech, depending on concentration in MPA inhibits cultural and antigenic properties of E. coli. The results indicate the perspective of using cultural water, which contained medicinal leeches as a source of biologically active substances with a bacteriostatic effect on opportunistic bacteria.*

*Key words: Escherichia coli, biologically active substances, medicinal leech, cultural water, bacteriostatic effect.*



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. – М.: МИА, 2003. – 236 с.*
2. *Баскова И.П., Завалова Л.Л. Полифункциональность дестабилазы-лизозима из медицинской пиявки // Биоорганическая химия. – 2008. – 34, № 3. – С. 337–343.*
3. *Гирудотерапия: руководство / Под ред. В.А. Савинова. – М.: Медицина, 2004. – 432 с.*
4. *Каменев О.Ю., Барановский А.Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. – СПб.: Весь, 2006. – 304 с.*
5. *Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П. Практична мікробіологія: посібник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.*
6. *Коритнюк Р., Борисенко Т. Пиявочка–козявочка // Фармацевт–практик. – 2009. – № 1. – С. 34–37.*
7. *Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / Под ред. В.В. Миньшикова. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.*
8. *Парамонова Н.Ю., Фириченкова С.В. Результаты территориального мониторинга антибиотикорезистентности кишечной палочки // Вестник ветеринарии. – 2011. – № 4 (59). – С. 78–79.*
9. *Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР МЕД, 2001. – 768 с.*
10. *Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. Заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.*
11. *Рассадина Е.В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях: Дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2006. – 199 с.*
12. *Abdullah S., Dar L. M., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery // Arch. Clin. Exp. Surg. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 172–180.*
13. *Kohanski M.A., Dwyer D.D., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8. – P. 423–435.*
14. *Laufer A.S., Siddall M.E., Graf J. Characterization of the digestive-tract microbiota of *Hirudo orientalis*, a European Medicinal leech // Applied and environmental microbiology. – 2008. – 74, № 19. – P. 6151–6154.*

Стаття надійшла до редакції 30.10.2013 р..

