

ЛИЗИС КЛЕТОК ВОЗБУДИТЕЛЯ ПСЕВДОМОНОЗОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS*

И.Б. Павлова, младший научный сотрудник¹
Т.Г. Юдина, доктор биологических наук, профессор, доцент¹
И.П. Баскова, доктор биологических наук, профессор¹
Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент²
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор²
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор²
ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова», г. Москва¹
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», г. Ульяновск²
8(8244) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Ключевые слова и их сокращения: гирудотерапия (ГТ); медицинская пиявка (МП); секрет слюнных клеток (ССК); псевдомоноз; трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ); *Pseudomonas aeruginosa*; *Aeromonas hydrophila*; *Hirudo medicinalis*.

Установлено, что симбионт медицинских пиявок – бактерия *Aeromonas hydrophila* нечувствительна к антимикробному действию секрета слюнных клеток (ССК) своего хозяина медицинской пиявки (МП) *Hirudo medicinalis* (при определении активности растворов секрета слюнных клеток с концентрацией белков до 100 мкг/мл методом диффузии в агар). Определены МИКи двух растворов ССК МП для возбудителя псевдомонозов *Pseudomonas aeruginosa*, а также выживаемость клеток этих бактерий после антибиотического влияния на них ССК. Исследование с помощью трансмиссионной электронной микроскопии лизиса клеток *P. aeruginosa* под действием ССК *H. medicinalis* показало, что основная причина гибели бактерий – нарушение проницаемости наружной и внутренней цитоплазматических мембран

Введение. В настоящее время увеличивается количество заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, в частности, синегнойной палочкой *Pseudomonas aeruginosa*, повсеместно выделяемой из окружающей среды, продуктов питания, живых объектов. Инвазивные штаммы этой бактерии патогенны для множества животных и для человека, вызывают инфекционные заболевания – псевдомонозы. Псевдомонозы у взрослых сельскохозяйственных животных обычно проявляются маститами, вагинитами, эндометритами, а у молодняка – пневмониями, диареей, артритом, и др. *P. aeruginosa* также часто осложняет многие патологические процессы как инфекционной, так и неинфекционной этиологии. Лечение псевдомонозов проводят с помощью комплекса различных лекарственных средств, в том числе – множества антибиотиков [1]. Однако, известна способность *P. aeruginosa* к образованию био-

плёнок, при этом увеличивается устойчивость бактерии к воздействию лекарств в десятки и сотни раз. Также установлено расширение резистентности *P. aeruginosa* к применяемым антибиотикам. Антибиотикорезистентность микроорганизмов стала актуальной проблемой мирового значения. Всемирная Организация Здравоохранения работает в тесном сотрудничестве с Всемирной организацией по охране здоровья животных (МЭБ), Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО) над усовершенствованием методов борьбы с резистентностью к противомикробным препаратам, в том числе – над оптимальным использованием антибиотиков как у людей, так и у животных. ВОЗ разработала проект глобального плана действий по борьбе с устойчивостью микроорганизмов к противомикробным средствам [2].

Таким образом, в настоящее время значительно возросла ответственность при исполь-

зовании ветеринарных препаратов, которые должны обеспечивать не только эффективное лечение животных, но и продовольственную безопасность, являться экологически чистыми. В связи с этим актуально расширение применения в ветеринарии ГТ - лечения с помощью медицинских пиявок. ГТ используется на протяжении почти всей истории человечества для лечения множества болезней, травм. В настоящее время признана её высокая эффективность при микрохирургических и ряде других операций, для удаления венозного застоя, при лечении остеопорозов, сердечно-сосудистых, и многих других патологий [3 - 5]. В ветеринарной медицине ГТ всё шире применяют для лечения у сельскохозяйственных животных дисплазий, острых и хронических артритов, воспалений сухожилий, связок, заболеваний позвоночника, скрытого мастита, а также - для лечения широкого спектра заболеваний домашних животных [6 - 8].

При изучении научных основ ГТ получено много важных результатов, объяснивших лечебное действие МП. Описано антикоагулирующее; тромболитическое; противоишемическое; антигипоксическое; дренирующее; антимикробное; иммуностимулирующее действие ГТ, восстановление микроциркуляции, проницаемости сосудистой стенки, нервно-мышечной передачи импульсов, и ряд других эффектов. Установлено, что ССК МП содержит сбалансированный набор соединений пептидной, липидной, углеводной природы. Например, в его состав входит более сотни белков с молекулярной массой 10 – 97 кДа (это ферменты, ингибиторы протеиназ, модуляторы, белки с антимикробной активностью), более 150 низкомолекулярных соединений - нейромедиаторы, стероидные гормоны, гистамин, и другие. Доказано, что при укусе даже одной пиявки в организм человека попадает фармакологически значимая, достаточная для проявления биологической активности концентрация белков и ряда других компонентов секрета. Поэтому ССК МП считают основным гуморальным агентом, обеспечивающим высокую эффективность ГТ. Одним из важных компонентов ССК является полифункциональный фермент дестабилаза-лизоцим (Д-Л), который проявляет гликозидазную, мурамидазную, эндо-изопептидазную и антимикробную активности. Концентрация Д-Л в ССК невелика – примерно 1%. Установлено, что в ССК МП может содержаться несколько изоформ Д-Л, лизоцимы других типов, а также другие литические ферменты. Кроме того, есть данные о множе-

стве неописанных в литературе новых белков в составе ССК [3, 9 - 11].

Ранее мы установили, что антимикробная активность нативного ССК МП выше, чем у рекомбинантного фермента дестабилазы-лизоцима (рД-Л), полученного путём ренатурации из телец включений, образуемых в клетках кишечной палочки. Причём, спектр антибиотического действия у ССК шире, чем у этого белка [12, 13]. Однако, антибиотическое влияние ССК МП на *P. aeruginosa* ранее не изучали.

Подобно многим представителям р. *Pseudomonas*, ряд представителей *P. aeruginosa* также являются патогенами, чаще всего – рыб и других водных животных, а также признаны факультативными патогенами для людей с ослабленным иммунитетом. *Aeromonas spp.* и *Pseudomonas spp.* имеют много сходных признаков, в том числе, у них выявлена широкая резистентность к антибиотикам, тяжёлым металлам, и др. [14]. Бактерия *Aeromonas hydrophila* известна, как симбионт медицинской пиявки [15].

В связи с этим сравнительное изучение чувствительности *P. aeruginosa* и *A. hydrophila* к антибиотическому действию ССК МП представляет несомненный интерес. Важны также исследования основных этапов разрушения клеток в результате антибиотического действия ССК. Мы не обнаружили публикаций об изучении картины гибели клеток микроорганизмов под влиянием пиявочного секрета.

Целью нашей работы явилось изучение антибиотического действия ССК МП на возбудителя псевдомоноза *P. aeruginosa*, а также на симбионта МП *A. hydrophila*, в том числе - изучение картины гибели бактериальных клеток под влиянием ССК МП.

Задачи: 1) Определить величину антибиотического действия ССК МП на бактерий с помощью метода диффузии в агар, а также контроля жизнеспособности клеток после воздействия на них ССК МП. 2) Изучить с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) картину лизиса клеток *P. aeruginosa* под влиянием ССК МП.

Материалы и методы исследования. Отбирали нативный, свободный от примесей, ССК от МП *H. medicinalis* описанным методом, для чего использовали по 20 особей МП, выращенных на биофабрике и купленных в аптеке. Концентрацию белка в ССК определяли по известному методу Брэдфорд [9].

Работу проводили с культурой *P. aeruginosa* шт. 47 из Музея культур кафедры микробиоло-

Таблица 1 - Минимальные ингибирующие концентрации растворов ССК МП для *Pseudomonas aeruginosa*

Месяц получения ССК от МП	Концентрация белков в полученном растворе ССК, мг/мл	МИК растворов ССК, для <i>P. aeruginosa</i> мкг/мл
Сентябрь	0,7	3
Январь	0,9	20

Таблица 2 - Выживаемость клеток *Pseudomonas aeruginosa* после влияния на них раствора секрета слюнных клеток медицинской пиявки.

Время действия раствора ССК МП на клетки, мин.	% выросших колоний <i>P. aeruginosa</i> (по сравнению с контролем) после действия на бактериальные клетки растворов ССК с ранее определёнными МИК:	
	МИК 3 мкг/мл	МИК 20 мкг/мл
10	41,5±1,72	93,7±4,70
30	12,3±0,39	49,8±1,37
60	1,7±0,05	10,5±0,29
120	0	0

гии МГУ (MDMSU), а также *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* шт. 8 из Музея культур Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

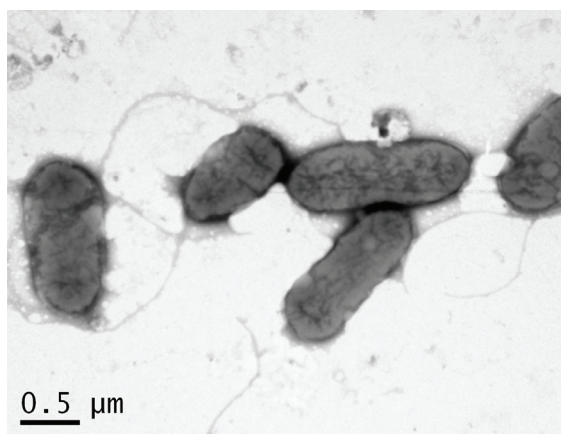
Бактерий выращивали при 37°С в течение суток на агаризованной питательной среде следующего состава: K_2HPO_4 – 7,0; KH_2PO_4 – 2,0; цитрат натрия - 0,4; $MgSO_4$ - 0,05; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; H_2O дист.; pH 7,1. К среде добавляли 10 г/л триптозного бульона и 10 г/л глюкозы; а также 15 г/л высокоочищенного агара («Sigma, или «Difco», США). На этой же среде проводили определение антимикробной активности ССК методом диффузии в агар.

Антибиотическую активность по отношению к исследуемым бактериям раствора ССК с известной концентрацией белков определяли методом диффузии в агар, учитывая размер зоны подавления роста тест-культуры от конца лунки. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) растворов ССК МП определяли известным способом путем учета антибиотических активностей ряда разведений. МИК выражали в мкг/мл раствора белка, внесенного в лунку. Жизнеспособность бактерий определяли известным способом путём подсчёта колоний, выросших из сохранивших жизнеспособность клеток после влияния на них ССК [13]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel; достоверность различий $p < 0,05$.

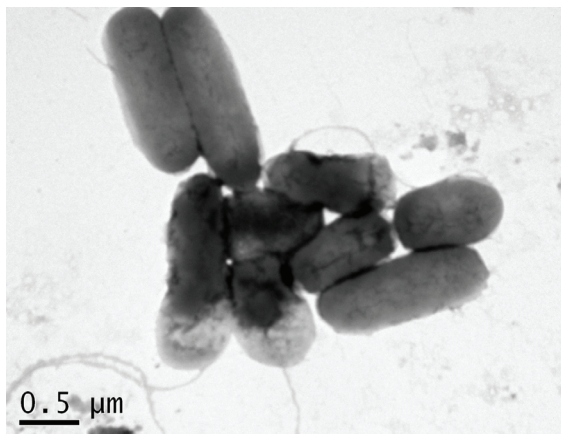
Исследовали с помощью ТЭМ препараты, полученные методом негативного контрастирования. Для приготовления таких препаратов каплю суспензии клеток *P. aeruginosa* после их инкубации с ССК МП (в котором определена концентрация белка), а также суспензию - контроль наносили на сеточки с формваровыми пленками. Через одну минуту избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Затем наносили на сеточки каплю 2%-ного раствора фосфовольфрамовой кислоты. Через 1 мин избыток жидкости удаляли. Препараты просматривали в трансмиссионном микроскопе Geol JEM 1011 (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ, с помощью Erlangshen ES 500 W Model 782, gatan, с программой Gatan Digital Micrograph.

Результаты и их обсуждение. Бактерии *A. hydrophila* – симбионты кишечника *H. medicinalis*, оказались практически устойчивы к влиянию раствора ССК МП в используемых концентрациях (до 100 мкг/мл). Основной причиной такой устойчивости является, по-видимому, эволюционная приспособленность бактерий-симбионтов к обитанию в организме своего хозяина – МП [15]. Поэтому дальнейшие исследования антибактериального действия ССК проводили только по отношению к *P. aeruginosa*. Мы определили МИКи для *P. aeruginosa* двух растворов ССК МП, полученных в различное время 2012 года от МП из разных партий (табл.1).

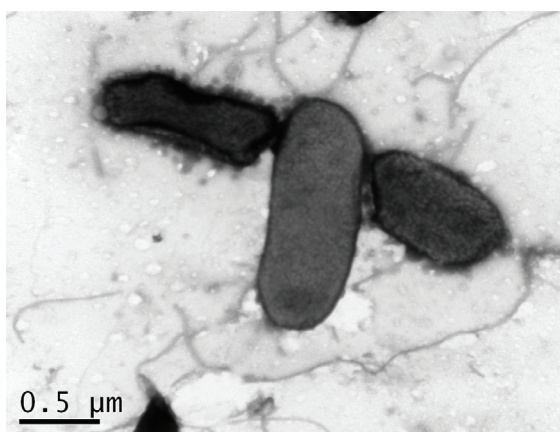
Эти МИКи составили: 1) 3 мкг/мл (ССК собран в сентябре, концентрация белков в растворе 0,7 мг/мл) 2) 20 мкг/мл (ССК собран в январе, кон-



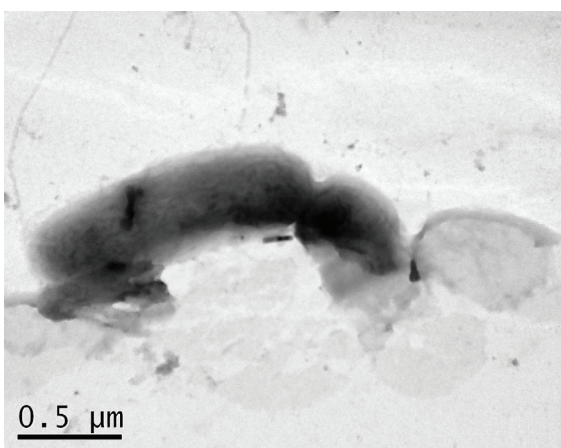
1)



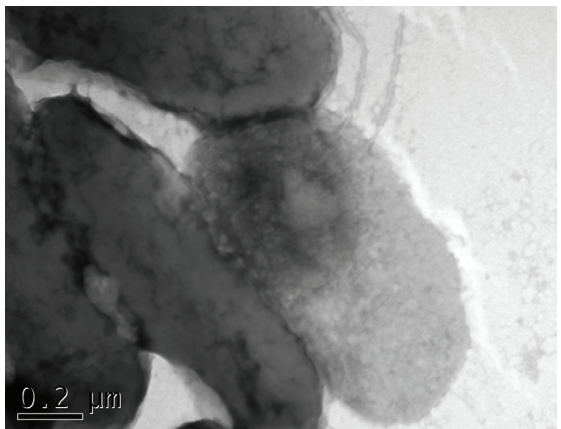
2)



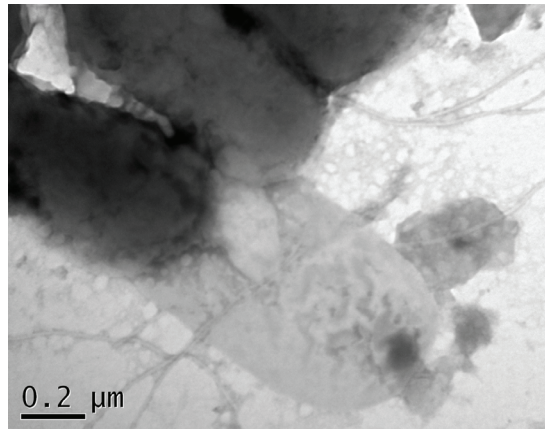
3)



4)



5)



6)

Рисунок 1 - Вид в ТЭМ лизирующихся под влиянием ССК МП (25 мкг/мл, 37° С) клеток *P. aeruginosa*:

1) – контроль;

2), 3) – скопление клеток за счёт нарушения заряда их поверхности и проницаемости наружной мембраны у части из них, начало процесса просветления цитоплазмы (фото 1 – 3: через 5 мин. влияния ССК МП);

4) – лизис клеток и остатки лизированных клеток;

5) – разбухание клеток, увеличение количества мембранных везикул, разрушение клеточных стенок;

6) – разбухание и лизис клеток в составе конгломерата (фото 4 – 6: через 10 мин. влияния ССК МП).

Последующая картина полного лизиса клеток не представлена.

центрация белков в растворе 0,9 мг/мл). Общая концентрация белков в ССК зависит от разбавления его физиологическим раствором при получении от МП. Кроме того, ССК должен быть достаточно разбавлен для возможности определения его антибиотической активности методом диффузии в агар. Известно, что в составе ССК изменяется соотношение белков (прежде всего – количественное) в зависимости от сезонности. Самым активным секрет бывает в тёплый летне-осенний период. Это подтвердили и наши исследования. Кроме того, активность ССК отличается в разных партиях МП - зависит от возраста пиявок, их физиологического состояния, и др. [3, 9, 10]. Определение в двух разных опытах жизнеспособности клеток бактерий после влияния на него растворов ССК одинаковой концентрации (25 мкг/мл) привело к результатам, представленным в таблице 2.

Из полученных данных видно, что под влиянием 25 мкг/мл более активного из растворов ССК (с МИК 3 мкг/мл) большинство клеток теряют жизнеспособность и лизируются через полчаса. Потеря жизнеспособности клеток под действием менее активного ССК (с МИК 20 мкг/мл) полностью завершается примерно через два часа инкубации клеток при 37° С. ССК сохранял при 4° С свою антимикробную активность в течение полугода.

На рисунке 1 представлена картина лизиса клеток *P. aeruginosa* после их инкубации с 25 мкг/мл раствора ССК МП (МИК 3 мкг/мл) в течение 5 и 10 мин.

Таким образом, инкубация ССК МП с клетками возбудителей псевдомоноза приводит к началу лизиса этих клеток уже через несколько мин. при 37° С. Процесс лизиса клеток начинается с образования небольших конгломератов и нарушения проницаемости наружной мембраны, а затем и её разрушения. Также наблюдается увеличение количества мембранных везикул, образование которых характерно для многих грамотрицательных бактерий. Разрушение клеточных стенок проходит наряду с интенсивным разбуханием клеток, просветлением их цитоплазмы, благодаря нарушению проницаемости внутренней мембраны. Процесс завершается лизисом клеток, ещё раньше потерявших жизнеспособность.

Выводы. Следовательно, ССК МП способен оказывать антимикробный эффект на возбудителя псевдомонозов *P. aeruginosa*. Картина гибели клеток демонстрирует разрушение клеточных оболочек и нарушение проницаемости мембран, что проявляется в просветлении цитоплазмы, разбухании клеток и заканчивается лизисом *P. aeruginosa*. По-видимому, основная причина гибели бактерий - нарушение проницаемости наружной, а затем и внутренней цитоплазматических мембран.

Полученные результаты дают основание для дальнейших исследований с целью расширения использования ГТ в борьбе с псевдомонозами у человека и животных.

Библиографический список:

1. Пруцаков, С.В. Терапия животных при псевдомонозе. / С.В. Пруцаков, И.А. Болоцкий, В.И. Семенов, [и др.] // АгроРынок. На стол ветеринарному врачу. - 2013. - №2. - с. 22 - 25.
2. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Publication details. 257 p. URL: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> - дата обращения 02.05.2015.
3. Баскова, И.П. Фармация медицинской пиявки. // Сборник «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». – Крым. - 2012. - С. 79 – 81.
4. Поспелова, М.Л. Гирудотерапия в неврологии. Применение гирудотерапии в лечении цереброваскулярных заболеваний. / М.Л. Поспелова, О.Д. Барнаулов // Издательство: LAP LAMBERT Academic Publishing. - 2012г. - 224 с.
5. Elyassi, A.R. Medicinal leech therapy on head and neck patients: a review of literature and proposed protocol. / A.R. Elyassi, J. Terres J., H. Rowshan // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. - 2013. - 116(3). - P. 167-172.
6. Попов, Л.К. Способ лечения скрытого мастита у коров. / Л.К. Попов, А.Н. Петров, А.В. Попов. // Патент РФ 2157696. Оpubл. 20.10.2000.
7. Лукоянова, Л. А. Патогенетическое обоснование использования гирудотерапии при интоксикационном синдроме у собак. Дис. . канд. вет. наук. Санкт-Петербург. - 2009. - 130 с.
8. Sobczak, N. Hirudotherapy in veterinary medicine. / N. Sobczak N, M.Kantyka // Ann. Parasitol. – 2014.;- 60(2).С. 89-92. PMID: 25115059.

9. Баскова, И.П. Белки и пептиды секрета слюнных желез медицинской пиявки видов *Hirudo verbana*, *Hirudo medicinalis* и *Hirudo orientalis*. / И.П. Баскова, Е.С. Кострюкова, М.А. Власова [и др.] // Биохимия. - 2008. - №73. - Вып. 3. - С. 388-394.
10. Баскова, И.П. Лизоцимная активность секрета слюнных желез медицинской пиявки видов: *H.verbana*, *H.medicinalis* и *H.orientalis*. / И.П. Баскова, О.В. Харитоновна, Л.Л. Завалова // Биомед. Химия.- 2011. – 57.- вып.5. – С. 511-518.
11. Lemke, S. May Salivary Gland Secretory Proteins from Hematophagous Leeches (*Hirudo verbana*) Reach Pharmacologically Relevant Concentrations in the Vertebrate Host? / S. Lemke, C. Müller, E. Lipke [et al.] // PLoS One. – 2013.- v. 8. - №9. – 1 – 7.
12. Го, Даньян. Сравнение антибиотического действия секрета слюнных клеток медицинской пиявки и фермента дестабилазы-лизоцима, входящего в состав этого секрета. / Го Даньян, И.Б. Павлова // Медицинский академический журнал. – 2012. – №5. - С. 485 – 486.
13. Yudina, T.G. Antibacterial and antifungal functions of medicinal leech recombinant destabilase-lysozyme and its heated-up derivative. /T.G. Yudina , Danyang Guo, N.F. Piskunkova [et al.] // Frontiers of Chemical Science and Engineering. - 2012. - v. 6. - №2. - p. 203 – 209.
14. Matuar, F. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). / F. Matuar, A. Tamer, U. Yasemin // Environ. Monit. Assess. – 2010. – p. 309 – 320.
15. Maltz, M.A. Metagenomic analysis of the medicinal leech gut microbiota. / M.A. Maltz, L. Bomar, P. Lapierre [et al.] // Front. Microbiol. – 2014. - 5. - 151 – 159.

CELL LYSIS OF THE PSEUDOMONOSIS EXCITER PSEUDOMONAS AERUGINOSA UNDER ACTION OF THE CELLS SECRET OF THE SALIVARY FROM MEDICINAL LEECH HIRUDO MEDICINALIS

I.B. Pavlova, T.G. Yudina, I.P. Baskova, N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, S. N. Zolotukhin

Keywords: *hirudotherapy; medicinal leech (ML); salivary cell secretion (SSC); pseudomonosis, transmission electron microscopy (TEM); Pseudomonas aeruginosa; Aeromonas hydrophila; Hirudo medicinalis.*

It is found that the leech symbiont A. hydrophila bacterium is insensitive to the antimicrobial action of the secret of the salivary cells (SSC) its host H. medicinalis (when determining the activity of SSC solutions with protein concentration to 100 µg / ml by agar diffusion method). MIC identified for two solutions of SSC for pathogen pseudomonosis P. aeruginosa, and cell survival of these bacteria after antibiotic effect on their of SSC. Antibiotic activity of SSC depends from the season - it is higher in the summer. Research by transmission electron microscopy of cell lysis P. aeruginosa under the action of H. medicinalis SSC revealed that the main cause of death of these bacteria - a violation of the permeability of outer and inner cytoplasmic membranes.