

УДК 579.66

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ
НА РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ ЭШЕРИХИИ КОЛИ
(*ESCHERICHIA COLI*)**

Смагина Галина Ивановна

к.б.н., ассистент

Муминов Диор Дильшатovich

Бикметова Алия Маратовна

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный
медицинский университет»

Аннотация: Было проведено исследование влияния экстракта простаты, выделенного из ткани предстательной железы быков и бычков, достигших половой зрелости, на рост и размножение микроорганизма *E.coli*. Данный микроб является наиболее часто встречающимся этиологическим агентом хронического бактериального простатита. Исследована антибиотико-чувствительность предоставленного штамма, проведено культивирование и определение микроорганизма. Учёт результатов проводили по поведению подопытных мышей, увеличению и уменьшению массы тела, что говорит о развитии воспалительного процесса, смертности. Вскрытие погибших животных показало наличие визуальных морфологических изменений, наличия воспаления в организме мышей. В результате проведенного исследования обнаружено, что при лечении мышей биологически полиактивным экстрактом простаты бычков есть признаки улучшения физического состояния мышей, сохранение активности на прежнем уровне, проявления полового влечения сразу после введения препарата в холку. Проведённое исследование свидетельствует о нарушении микроциркуляции в организме подопытных мышей. При этом нарушение движения крови в предстательной железе и других органах напрямую связано с действием микроорганизма *E.coli*.

Ключевые слова: микроорганизмы, кишечная палочка, животные, простатит, экстракт простаты.

STUDY OF THE INFLUENCE OF EXTRACTS FROM THE ORGANS OF ANIMALS ON THE GROWTH AND REPRODUCTION OF *ESCHERICHIA COLI*

**Smagina Galina Ivanovna
Muminov Dior Dilshatovich
Bikmetova Aliya Maratovna**

Abstract: A study was carried out on the effect of prostate extract isolated from the prostate tissue of bulls and gobies that reached puberty on the growth and reproduction of the microorganism *E. coli*. This microbe is the most common etiological agent of chronic bacterial prostatitis. The antibiotic sensitivity of the provided strain was investigated, the cultivation and determination of the microorganism were carried out. The results were taken into account according to the behavior of the experimental mice, the increase and decrease in body weight, which indicates the development of the inflammatory process, mortality. An autopsy of the dead animals showed the presence of visual morphological changes, the presence of inflammation in the body of the mice. As a result of the study, it was found that when treating mice with a biologically polyactive extract of the prostate of bulls, there are signs of an improvement in the physical condition of mice, retention of activity at the same level, manifestations of sexual desire immediately after the injection of the drug to the withers. The research carried out indicates a violation of microcirculation in the body of experimental mice. At the same time, the violation of the movement of blood in the prostate gland and other organs is directly related to the action of *E. coli* microorganism.

Key words: microorganisms, *E. coli*, animals, prostatitis, prostate extract.

Актуальность. С каждым днём среди мужского населения репродуктивного возраста растет число заболеваний предстательной железы. [5, с.3]. Группа британских экспертов по изучению простатита (PERG) во главе с J. Rees в клинических рекомендациях по лечению и диагностике хронического бактериального простатита (ХБП) утверждают, что в течение жизни от 35 до 50% мужчин отмечают симптомы, по их мнению связанных с простатитом [11, с.509].

Инфекция способна проникать в половые пути экзогенно (по причине несоблюдения гигиены), эндогенно (в случае предварительного наличия

микроорганизма в макроорганизме, происходит диссеминация микроба в органы и ткани гематогенным и лимфогенным путями).

Основным общепризнанным методом лечения больных хроническим простатитом в настоящее время является антибактериальная терапия [12, с.275], представляющая собой терапию «первой линии». Кроме того, используются препараты биологического происхождения [10, с.798]. Так уже в течение последних 30 лет на рынке представлен цитомедин предстательной железы крупного рогатого скота – лиофилизированный очищенный экстракт тканей. Препарат, как уже отмечалось, животного происхождения, полипептидной природы, получаемый из ткани предстательной железы быков и бычков, достигших половой зрелости. На рынке представлен в форме Суппозиторий «Простакор», также «жидкий раствор Простакор для в/м введения», комбинированный препарат Простакора и интерферона «Интепрост» [3, с. 5].

Экстракт простаты – комбинированный препарат, который способен действовать селективно на простату, уменьшать воспаление, степень отека, нормализовать функцию клеток, увеличивать число лецитиновых зерен в секрете ацинусов, стимулировать мышечный тонус мочевого пузыря. Как показывает ряд исследований экстракт является полифункциональным биологически активным веществом, которому характерна большая направленность действия [3, с.7,9].

Можно предположить, что спектр действия данного экстракта простаты намного больше: его антимикробная и противовирусная активности, иммунная модуляция распространяются на гнойно-воспалительные заболевания, что зачастую вызываются условно-патогенным *E.coli*.

Сегодня исследователи, согласно рекомендациям Европейской Ассоциации Урологов, выделяют 2 основные группы бактерий, рассматриваемых как этиологических агентов бактериального простатита: представителей семейства *Enterobacteriales*: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, некоторые таксоны грамположительных бактерий (*E. faecalis*), грамотрицательных неферментирующих бактерий (*P. aeruginosae*), а также различные представители как условно-, так и облигатно-патогенной микрофлоры, роль которых в этиологии заболевания не до конца определена. [3, с. 2]

Самыми распространенными возбудителями простатита являются штаммы кишечной палочки (*E.coli*), которые определяются в 80% случаев,

поэтому актуальной проблемой является изучение механизма действия экстракта простаты на возбудителя *in vivo*.

Цель данного исследования заключается в изучении возможного антибактериального действия экстракта из ткани предстательной железы на *E.coli in vivo* на мышах.

Задачи:

1) изучить морфологию, тинкториальность, патогенность, вирулентность *E.coli*;

2) собрать литературные данные по биологической активности экстракта из ткани предстательной железы, представленных такими препаратами, как суппозитории «Простакор», «Простакор жидкий раствор для внутримышечного введения», комбинированный полифункциональный препарат «Простакора» и интерферона- «Интепрост»;

3) изучить влияние экстракта простаты путем введения лекарства подкожно (*subcutaneously*);

4) провести сравнительную характеристику действия экстракта простаты в одинаковой концентрации на мышах, зараженных чистой культурой *E. coli* в концентрации:

$(1 \times 10^5 - 1 \times 10^9)$ КОЕ/мл *in vivo*.

5) изучить антибиотикорезистентность *E. coli* методом стандартных дисков.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО Башкирского государственного медицинского университета Минздрава России (Уфа).

Экспериментальные исследования по изучению биологических свойств (патогенности и вирулентности штаммов) проведены в соответствии с методическими рекомендациями «Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза» (1992), и методическими указаниями Минздрава СССР №№ 4263-87, 2620-82 [4-7, 10]

В экспериментах использовали нелинейных белых мышей самцов ($n=28$) со средней массой тела 24 г. Животных содержали на стационарном пищевом рационе в течение всего эксперимента со свободным доступом к пище и воде. Статистическая группа составляла от 2 до 5 особей. Перед заражением животных опытной группы ($n=20$) взвешивали и маркировали. Мышам

контрольной группы (n=8) окрашивали спину (простагор), левый бок (*E.coli*) и не окрашивали (физ. раствор);

Мышам опытной группы вводили внутрибрюшинно разведения *E. coli*, в концентрации: (1×10^5 – 1×10^9) КОЕ/мл, лечили зараженных животных инъекционным препаратом Простагор® (Микроген, раствор для внутримышечного введения 5 мг/мл, серия У330618, годен до 07.21) в концентрации 0,015 мг/мышь подкожно в холку.

Объектом изучения являлась чистая культура *E.coli*, выделенная из кала больной женщины с подозрением на дисбактериоз.

Для культивирования *E. coli* использовали мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ) [2, с. 1]. Для получения исходных взвесей микроорганизмов биопрепаратов 1-3 посева инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Затем бактерии смывали с МПА физиологическим раствором (натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 %, серия 180419, годен до 05.21).

Полученную взвесь микроорганизмов стандартизовали путем визуального сравнения со стандартом мутности № 0,5 ($1,5 \times 10^9$ колониеобразующих единиц в 1 миллилитре, КОЕ/мл) набора стандартов мутности Test tubes McFarland standard set (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Mumbai, India). Затем ее ($1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл) разводили физиологическим раствором до концентрации 1×10^9 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в 1 мл) и готовили 10-ти кратные разведения (1×10^8 - 1×10^5) КОЕ/мл для заражения. Контроль разведения проводили путем посева 1 мл разведения 1×10^2 КОЕ/мл в чашки Петри с МПА (3 чашки на разведение микроорганизмов). Посевы инкубировали в течение 24 часов, с помощью полуавтоматического счетчика колоний («Прибор ПСБ», Россия) производили подсчет выросших на чашках Петри с МПА колоний микроорганизмов (м/о) исследуемого разведения (1×10^2 КОЕ/ч) и рассчитывали среднюю концентрацию (КОЕ/мл) исходной микробной взвеси разведения 1×10^9 КОЕ/мл.

Определение чувствительности исследуемого *E. coli* проводили стандартным диско-диффузионным методом (далее по тексту ДДМ). Данный метод определения чувствительности основывается на способности антибиотических препаратов диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, на которую нанесены микроорганизмы, тем самым локально угнетается рост микроорганизмов. Аппликация дисков проведена с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки

и между дисками 15 - 20 мм. Диски равномерно контактировали с поверхностью агара. [1, с. 83]

Морфологию колоний изучали после 3-7 суток инкубирования посевов микроорганизмов на МПА в термостате (Касимский приборный завод, Россия) при 37°C (рис.1).



Рис. 1. Изучение посевов колоний *E. coli*

Определение устойчивости выделенных штаммов *E.coli* к антибиотикам проводился ДДМ.

Результаты

При изучении невооруженным глазом в проходящем и отраженном свете морфологии выросших на МПА колоний *E. coli* через 2 дня инкубирования, был выявлен ряд характеристик *E.coli*: выпуклые крупные (4-5 мм) и средние (2-4 мм) в диаметре многочисленные колонии, круглой формы, полупрозрачные белые R-типа (рис.2), что соответствует литературным данным [2, с. 357].

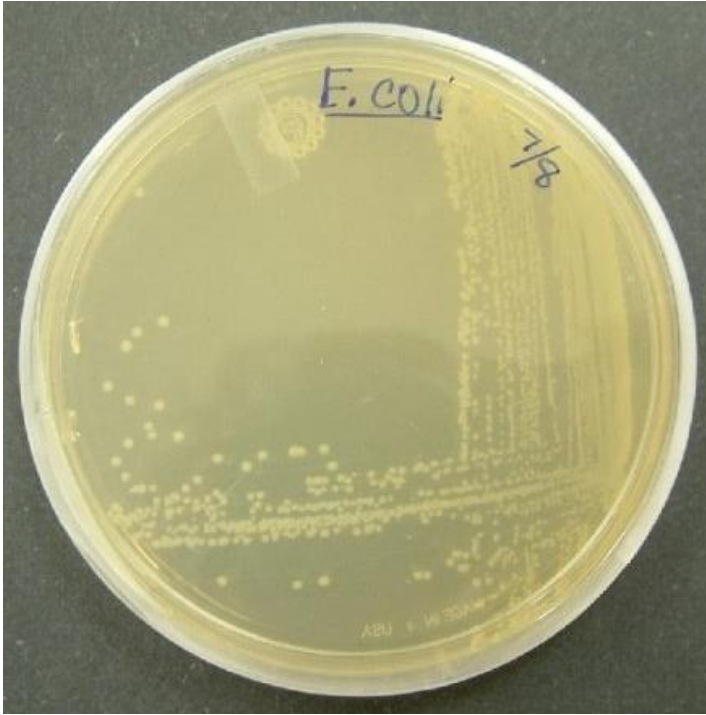


Рис. 2. Рост колоний E.coli на МПА

Изучение антибиотикорезистентности чистой культуры *E. coli* вышеописанным методом представлено на рисунке 3:



Рис. 3. Исследования антибиотикорезистентности ДДМ

На рисунке показано что, исследуемый штамм E.coli обладал различной устойчивостью к 9 антибиотикам: цефазолин, тетрациклин, доксициклин, гентамицин 120, бензил пенициллин, ампициллин, фуразолидон, флуконазол, амоксициллин.

Данные по степени устойчивости представлены в табл. 1.

Таблица 1

Оценка результатов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методами дисков и серийных разведений

№	Сокращение АБП	Полное название АБП	Результат ДДМ
1	цз	цефазолин	1,5 см
2	Те30	тетрациклин	1,7 см
3	Док	доксициклин	1,8 см
4	Ген120	гентамицин 120	2,6 см
5	Пен	бензил пенициллин	0,9 см
6	Амп	ампициллин	1,5 см
7	ФД	фуразолидон	1,9 см
8	ФЛН	флуконазол	0,6 см
9	АМХ	амоксициллин	1,5 см

В таблице показано, что из 9 исследованных антибиотиков штамм обладает резистентностью к бензилпенициллину, ампициллину и флуконазолу 0,9 см , 1,5 см и 0,6 см соответственно. К остальным 6 антибиотикам E.coli чувствителен: с максимальной чувствительностью с гентамицину (2,6 см). [1,с. 84]

Для лечения животных использовали Простакор в концентрации 0,0015

Исследование влияние Простакора на развитие инфекции у мышей, зараженных разведениями (10^8 - 10^5 КОЕ/мл) проводили в течение 15 суток по динамике гибели (табл. 2).

Таблица 2

Динамика гибели мышей опытной группы после заражения в течение 15 суток (15.12.2020-30.12.2020) наблюдения

Наименование группы	Разведение	Животные		Количество мышей, ж/м				
		Количество	маркировка	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15
Опытная (n=20)	1x 10 ⁸	5	голова	4/1	4/1	4/1	3/2	3/2
	1x 10 ⁷	5	п.з.л.	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	1x 10 ⁶	5	хвост	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
	1x 10 ⁵	5	п.п.л.	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
Контрольная (n=8)	Простакор	3	спина	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0
	1x 10 ⁹	3	л.б.	3/0	3/0	2/1	1/2	0/3
	Физ.раствор	2	белые	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0

Примечания: ж/м – живые/мертвые;

- п.п.л. – правая передняя лапа;
- п.з.л. - правая задняя лапа.
- л.б. – левый бок

В таблице показано, что гибель мышей обнаружена только в группе, получившей разведение 1x10⁸ КОЕ/мл (2 головы из 5). В остальных разведениях гибель отсутствовала. В контрольных группах не было гибели мышей, получивших физ. раствор и Простакор. Мыши, получившие разведение E. coli 1x10⁹ КОЕ/мл, выпали к концу исследования полностью.

Вскрытие погибших животных опытной группы показало наличие визуальных морфологических изменений в легких, лимфоузлах и гиперемии кровеносных сосудов подкожной клетчатки: (рис. 4).



Рис. 4. Внутренние органы погибшей мыши №1, зараженной разведением 1×10^8 м.к./мл, на 2 день эксперимента

На рисунке 4 выявлено наличие морфологических изменений в легких, подмышечных и подчелюстных лимфоузлах, сосудах:

1. легкие розово - красного цвета, имеет место выпот крови в грудную клетку;
2. подмышечные и подчелюстные лимфоузлы коричневого цвета, увеличены;
3. гиперемия кровеносных сосудов подкожной клетчатки;

Вскрытие погибших мышей контрольной группы 2 и здоровой мыши контрольной группы 3 показано на рисунке 5.



Рис. 5. Вскрытие мышей контрольной группы 3 и 2 соответственно

На рисунке 5 показано наличие патологических изменений внутренних органов, несовместимых с жизнью, у мышей контрольной группы 2 в отличие от контрольной группы мышей, получивших внутрибрюшинно однократно физиологический раствор в той же дозе.

1. легкие алого цвета, имеет место выпот крови в грудную клетку;
2. подмышечные и подчелюстные лимфоузлы коричневого цвета, значительно увеличены;

Исследование влияния Простакора на массу тела исследуемых животных (опытных и контрольных групп) показано в таблице 3.

Таблица 3

**Изменение массы мышей контрольной и опытной группы
в течение 10 дней**

Разведение	Окрас	Масса		День лечения (масса)									
		Об.	Ср.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				масса, г (ср)									
10^8	Голова	122г	24,4г	25	25,2	23,5	24	23,5	25	25,5	25,5	25,2	26,3
10^7	Пр.зад. лапа	120г	24,0г	24,8	24,8	24,4	24	23,6	24	24,4	24,2	24,8	24
10^6	хвост	117г	23,4г	26,2	26,2	25,8	26	25,6	25,6	26,2	25,4	25,6	25,6
10^5	пр.пер. лапа	119г	23,8г	26,4	26,2	26	25,8	26,4	27	26,8	26,6	26,4	27
Простакор	спина	95г	31,7г	29,67	30	29,7	29,3	29,7	31,3	31,7	32,3	34,7	35
10^9	лев. бок	66г	22,0г	23,67	24	23	22	21,7	21,3	21	20,7	20,3	20,7
физ. раствор	Без окраса	57г	28,5г	27	27	27,5	28,5	29	28,5	28	28,5	29	28,5

Как видно из таблицы 3, зараженные мыши, которые получали лечение (O_1, O_2, O_3, K_1) – сначала теряли массу, а затем с 5-6 дня лечения набирали. Масса 4 опытной группы, зараженная в разведение 10^5 , но не получавшая лечения, варьировалась в пределах нормы, что связано с малой концентрацией микробной взвеси разведения.

Контрольная группа 2 потеряла в массе по сравнению с началом эксперимента. Масса K_3 варьировалась в пределах нормы.

За время всего эксперимента выпало 2 мыши из опытной группы 1 разведения 1×10^8 КОЕ/мл и все из 2 контрольной группы 1×10^9 КОЕ/мл, которые были вскрыты.

Выводы

Доминирующая роль в этиологии бактериального простатита принадлежит *E.coli*. Наличие инфекции при ХБП в значительной степени

усложняет задачу лечения пациентов с ХБП. ДДМ показал, что *E.coli* обладают наибольшей антибиотикорезистентностью к бензипенициллину и флуконазолу. Самым действенным препаратом признан гентамицин.

При лечении мышей биологически полиактивным экстрактом простаты бычков мы выявили признаки улучшения физического состояния мышей, сохранение активности на прежнем уровне, проявления полового влечения сразу после введения препарата в холку, что проявлялось нападением одних самцов на других. При лечении белых мышей препаратом «Простакор» были заметные признаки здоровья особей на вскрытии, по сравнению с животными, которые не получали лечения.

Таким образом, проведённое исследование свидетельствует о нарушении микроциркуляции в организме подопытных мышей. При этом нарушение движения крови в предстательной железе и других органах напрямую связано с действием микроорганизма *E.coli*.

Список литературы

1. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. // Москва «Медицина» 1993 – 83, 84, 86
2. Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология.// М.:ООО «Медицинское информационное агентство», 2012.
3. Пат. 2160114 С1 RU, 7 А 61 К 35/48, 38/00, 38/21, 9/02. Ректальное средство для лечения хронических простатитов / Е. В. Бобкова, Г. И. Смагина, М. Х. Козырева. – Заявл. 06.10.1999; Оpubл. 10.12.2000 // Бюл. – 2000. – № 34.
4. Пат. 2186387 С2 RU, 7 G 01 N 33/48, А 61 К 35/48. Способ определения биологической активности препаратов из ткани предстательной железы/ Е. В. Бобкова, Г. И. Смагина. – Заявл. 31.05.2000; Оpubл. 27.07.2002 // Бюл. – 2002. – № 21.
5. Смагина Г.И. Биологическая активность экстракта предстательной железы крупного рогатого скота и биотехнологические основы разработки новых лекарственных препаратов.// автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.- 2006г.
6. Смагина Г. И. Изучение фракционного состава препаратов простатилена/ Смагина Г.И., Бобкова Е.В., Мельников Н.В // Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: Материалы Всероссийской конференции. – Уфа, 2000. Ч. 2. – С.99-102.

7. Смагина Г. И. Биологическая активность простатилена / Смагина Г.И., Бобкова Е.В. // Там же. – С. 102-104.
8. Урология [Электронный ресурс] / под ред. Д. Ю. Пушкаря - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2017. - <http://client.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970440803.html>
9. Фархутдинов М. Р. Изучение антиоксидантной активности препарата простатилена / Фархутдинов М.Р., Смагина Г.И., Мельников Н.В., Бобкова Е.В // БГМУ. – СПб, 1999. – С. 81.
10. Nickel JC, True LD, Krieger JN, Berger RE, Boag AH, Young ID. Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. BJU Int. 2001;87(9):797-805. PMID: 11412216
11. Rees J, Abrahams M, Doble A, Cooper A. Diagnosis and treatment of chronic bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a consensus guideline. BJU Int 2015;116(4):509–525. doi: 10.1111/bju.13101
12. Wagenlehner FM, Naber KG. Antimicrobial treatment of prostatitis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2003;1(2):275-282. PMID: 15482123

© Г.И. Смагина, Д.Д. Муминов, А.М. Бикметова, 2021