

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ВЛИЯНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ТРИХОМОНАДЫ IN VITRO

Морева Ж.Г., Гарасько Е.В.
ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава
Кафедра микробиологии и вирусологии

РЕЗЮМЕ Приводятся результаты экспериментально полученных распределений атипичных форм трихомонад по размерам для различных временных интервалов действия мирамистина. Отмечаются существенные изменения распределений в зависимости от длительности действия антисептика, что отражает морфологическую изменчивость трихомонад.

Ключевые слова: трихомонады, мирамистин, атипичные формы.

Среди инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), урогенитальный трихомониаз стоит на первом месте и выявляется у 14—60% мужчин и 67—100% женщин, больных инфекциями мочеполового тракта [9, 10].

Ведущую роль в профилактике ИППП играют антимикробные препараты: их адекватное применение определяет эффективность лечения. Оптимальное воздействие антимикробных препаратов возможно при определенной чувствительности к ним возбудителей инфекций.

Одним из современных лекарственных средств, используемых для профилактики мочеполовых инфекций, является мирамистин, производимый московской фирмой ЗАО «ИН-ФАМЕД» [3, 8]. По химическому составу препарат представляет собой аммониевое соединение с одной линейной гидрофобной группой $C_{13}H_{27}$ и бензильным радикалом у атома N. Мирамистин относится к антисептикам нового поколения из класса поверхностно-активных веществ (ПАВ) с высокими детергентными свойствами. Препарат обладает выраженным антимикробным действием в отношении широ-

кого спектра микроорганизмов, действует губительно на возбудителей заболеваний, передающихся половым путем, в том числе и на *Trichomonas vaginalis*, оказывает противогрибковый эффект.

В основе биологического действия антисептика лежит мембраноатакующий механизм, основанный на гидрофобном взаимодействии катионного радикала мирамистина с фосфатными группами липидов мембраны, а также антиферментный механизм, связанный с перестройкой энзиматической активности клетки [14].

Течение трихомонадной инфекции в настоящее время все чаще характеризуется выделением атипичной, малоподвижной (или неподвижной), безъядерной формы возбудителя, резистентной к протистоцидным препаратам [5, 6, 9], что затрудняет проведение эффективного лечения. Влияние антимикробных препаратов, также обладающих протистоцидным действием на *Trichomonas vaginalis*, освещается в работах многих авторов [1, 12—15]. Однако сведения о воздействии антисептических факторов на морфологию атипичных форм трихомонад не так многочисленны.

Moreva Zh.G., Garasko E.V.

PECULIARITIES OF ANTIMICROBIC PREPARATIONS INFLUENCE ON TRICHOMONAS IN VITRO

ABSTRACT Results of experimentally obtained dimensional assortment of *Trichomonas* atypical forms for different time intervals of miramistine effect are reported. Significant assortment changes are marked depending on antiseptic effect duration and it points out *Trichomonas* morphologic variability.

Key words: trichomonas, miramistine, atypical forms.

Поэтому целью работы явилось исследование влияния препарата мирамистин на морфологические особенности атипичных форм *Trichomonas vaginalis* in vitro.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучение антисептического эффекта мирамистина проводили на атипичных формах культуры *Trichomonas vaginalis*, полученных на питательной среде Тераса после посева клинического материала, забранного у пациентов с трихомонадной инфекцией.

Для этого пипеткой Пастера вносили в жидкую питательную среду количеством 4 мл патологический материал объемом 0,5 мл (посевная доза). Для подавления сопутствующей микрофлоры добавляли антибиотики — пенициллин, стрептомицин и нистатин в количестве 1000 Ед/мл.

Первый пассаж форм трихомонад получали на среде Тераса сложного состава, содержащей в качестве основных компонентов: печеночный бульон, раствор Рингера, α -цистеин, мальтозу, агар-агар, с добавлением в качестве обогащающего фактора сыворотки крови человека, инактивированной в течение 30 мин.

Культуру инкубировали двое суток при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ под слоем вазелинового масла для создания анаэробных условий. Далее делали пересевы на аналогичную среду, но с уменьшением количества антибиотиков до 250 Ед/мл. На шестые сутки получали последний пассаж культуры без добавления антибиотиков. После этого чистую культуру выдерживали в течение двух недель при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, что способствовало образованию значительного количества различных атипичных форм *Trichomonas vaginalis*.

Далее в опытную пробу, содержащую культуральную взвесь в количестве $56 \cdot 10^6$ клеток, вносили 0,01%-ный раствор мирамистина в соотношении 1:2. В качестве контроля служила культуральная проба без препарата. Опытные и контрольные пробы выдерживались при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 3 часов.

Для выявления морфологических изменений атипичных форм трихомонад делали мазки на предметном стекле, высушивали на воздухе, фиксировали 96%-ным этиловым спиртом, окрашивали 1%-ным водным раствором метиленового синего. Микроскопический анализ ($\times 600$) опытной и контрольной пробы проводили с интервалом 30 секунд в течение 15 минут; с интервалом 3 минуты в течение по-

следующих 2 часов 45 минут. Размеры трихомонад определяли при помощи окулярного микрометра. Для электронно-микроскопического исследования использовали метод реплик с оттенением золотом при помощи электронного микроскопа просвечивающего типа ЭМВ—100 Л ($\times 10\,000$).

После 3 и 24 часов воздействия мирамистина производили посев опытной пробы в питательную среду. На пятые сутки культивирования проводили морфологическую идентификацию трихомонад из опытных посевов микроскопическим способом, а также производили подсчет клеток в счетной камере Горяева.

Статистическую обработку осуществляли с использованием основных приемов математической обработки в области биологических и медицинских исследований [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные морфологические изменения атипичных форм трихомонад под действием антисептического фактора отражены в таблице 1.

При анализе более 150 препаратов отмечалось разрушение части популяции при увеличении интервала времени, а также усиление механизмов выживания в стрессовых условиях — процесса размножения почкованием и грануляции форм, распадающихся на отдельные мелкие образования, что напоминает шизогонию у простейших [4, 11]. Эти адаптивные процессы запрограммированы в геноме паразитов и связаны со «сменой способов жизни» [2].

Экспериментально полученные распределения указывают на морфологическую изменчивость трихомонад для различных интервалов действия мирамистина (рис. 1—3). Все представленные распределения форм простейших по размерам имеют в значительной степени выраженный характер асимметрии, на что указывает возрастающий эксцесс (от $E_x = 21,5$ до $E_x = 42,7$). В контрольной пробе отмечается преобладание кластера в интервале 15,6 до 21,3 мкм. Сюда входят формы со средними размерами, представленные в количестве 27,2% по отношению к общему числу исследуемых форм (табл. 2). Соответственно также многочисленны (27,2%) формы с размерами от 27 до 32,8 мкм. Мелкие формы в интервале от 4,1 до 9,8 мкм обнаружены в количестве 8%. Трихомонады крупных размеров — 50 мкм и более — встречались в количестве 0,3—1,6% по отношению к общему числу исследуемых форм.

Таблица 1. Морфологическая изменчивость атипичных форм *Trichomonas vaginalis* под влиянием препарата мирамистин

Интервал времени воздействия, t	Морфологические изменения <i>Trichomonas vaginalis</i>	
	Культура без препарата (контроль)	Культура с мирамистином (опыт)
0—40 с		Культура представлена простейшими различных размеров, значительно превосходящих размер клеток прокариот (рис. 5): амёбовидными правильными (7x5 мкм, 28,7 x 20 мкм), крупными (53 x 28 мкм), гигантскими округлыми (90,2 мкм) и овальными формами (рис. 9), цистоподобными правильно-округлыми — 4,1 мкм, реже — грушевидными жгутиковыми (рис. 6); встречаются формы неправильных очертаний, округлые формы в мелких скоплениях — «колониях». Оболочка клеток сравнительно ровная, у округлых клеток блестящая.
40 с — 10 мин	Культура в неизменном состоянии	У крупных форм наблюдается начало разрушения оболочки с образованием щелей. У круглых форм (32,8 мкм) начинается септирование оболочки.
10 мин — 25 мин	Культура в неизменном состоянии	У крупных форм (40 x 20 мкм) трещины оболочки доходят до 1/3 размера клетки, у некоторых клеток наблюдается отщепление отдельных фрагментов, у форм 57,4 x 28,7 мкм наблюдаются резкие выступы (гантелевидная клетка), встречаются клетки, состоящие из отдельных зернистых образований. У некоторых округлых клеток (14,35 x 10,25 мкм) заметно почкование. Встречаются клетки (20,5 мкм) с зубчатой оболочкой (рис. 8).
25 мин — 40 мин	Культура в неизменном состоянии	Продолжается процесс расщепления крупных форм, они принимают неправильные очертания. Преобладают трихомонады средних размеров (20,5; 24,6 мкм) с зубчатой оболочкой, встречаются амёбовидные клетки, фрагментированные на отдельные дольки и связанные только в центре. У шаровидных форм наблюдается продолжение почкования. Встречается много фрагментов неправильной формы и единичные крупные зернистые формы.
40 мин — 1 ч	Культура в неизменном состоянии	Продолжаются морфологические изменения трихомонад. Встречаются клетки размером 25 мкм правильной амёбовидной формы, без признаков повреждения. Имеются клетки с «рваными» контурами. Часть крупных клеток принимает гантелевидную форму. Много зернистых форм, которые начинают распадаться на округлые образования величиной 2 мкм. Много клеток с угловатыми очертаниями и обломков клеток. У крупных амёбовидных форм оболочки с четкими повреждениями.
1 ч — 2 ч	Культура в неизменном состоянии	Встречаются клетки с разной степенью повреждения. В крупных клетках щели доходят до 2/3 клетки. Усиливается почкование округлых форм. Поле зрения заполняют преимущественно очень мелкие формы (2 мкм), появившиеся в результате распада клеток зернистых форм. Заметны мелкие формы в значительном количестве (4,1; 8 мкм). Много фрагментов неправильной формы.
2 ч — 3 ч	Культура в неизменном состоянии	Описанные морфологические изменения ярко выражены у всех форм клеток. Встречаются амёбовидные (20; 25 мкм) неповрежденные формы. Популяция простейших меняется с сохранением форм среднего размера и мелких клеток правильной сферической формы (рис. 7). Крупные формы встречаются редко.
24 ч	Культура в неизменном состоянии	Сохраняются отдельные округлые клетки размерам 4,1; 16,4; 24,6 мкм и другие амёбовидные формы.

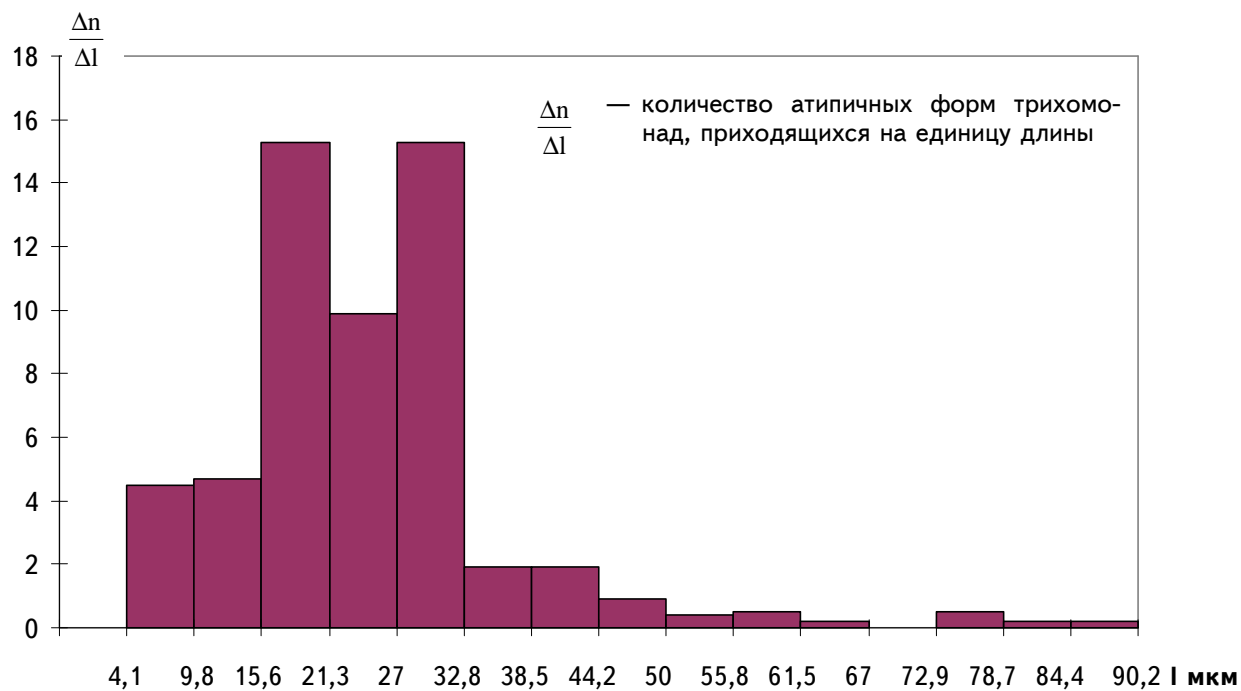


Рис. 1. Распределение атипичных форм трихомонад по размерам (мкм) при отсутствии действия мирамистина (контрольная культура)

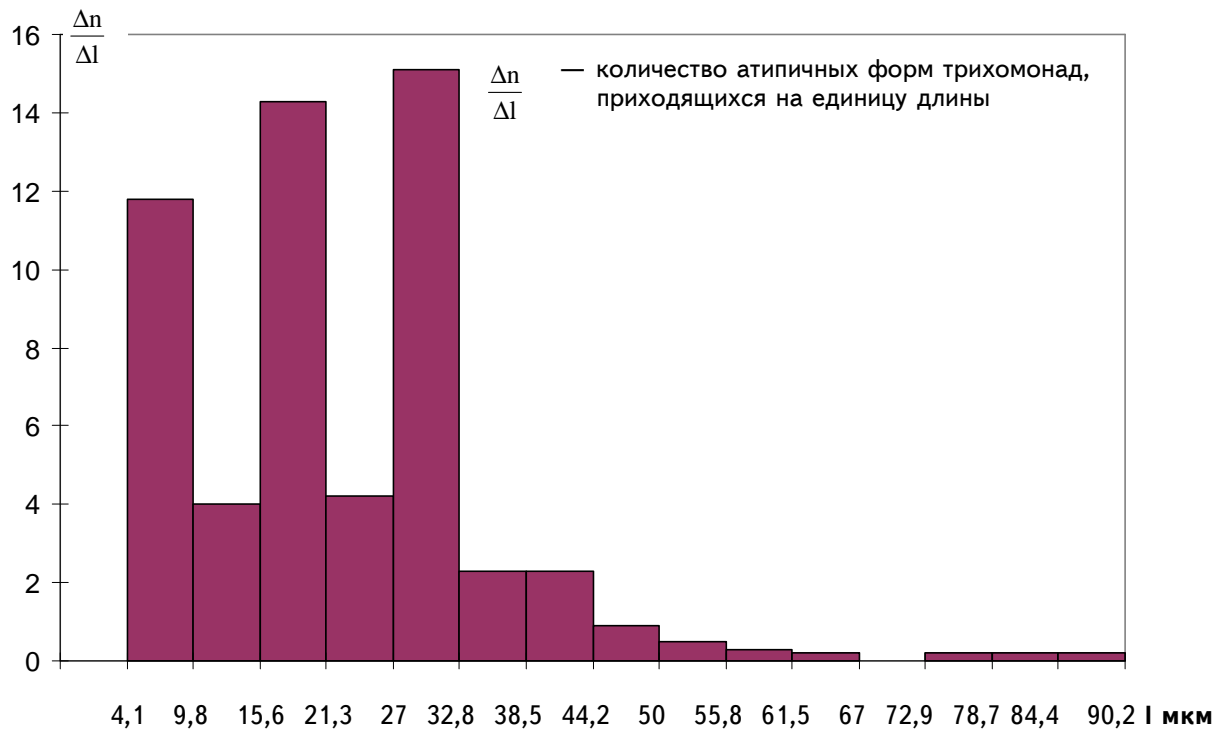


Рис. 2. Распределение атипичных форм трихомонад по размерам (мкм) при действии мирамистина в течение 30 мин, $c = 0,01\%$.

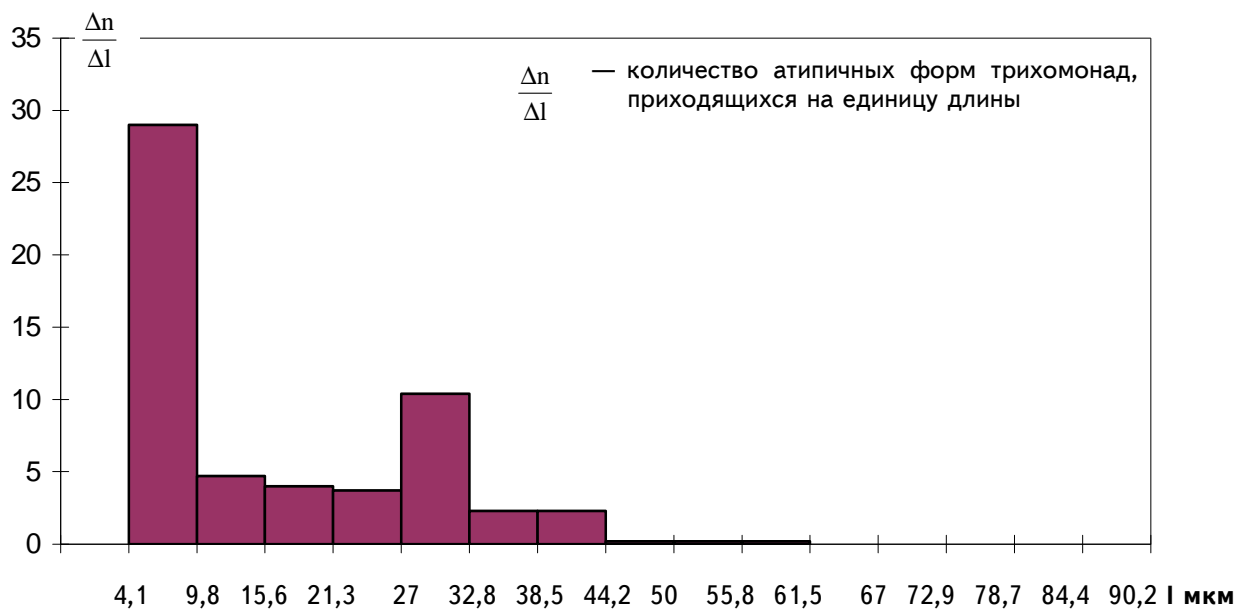


Рис. 3. Распределение атипичных форм трихомонад по размерам (мкм) при действии мирамистина в течение 3 ч, $c = 0,01\%$

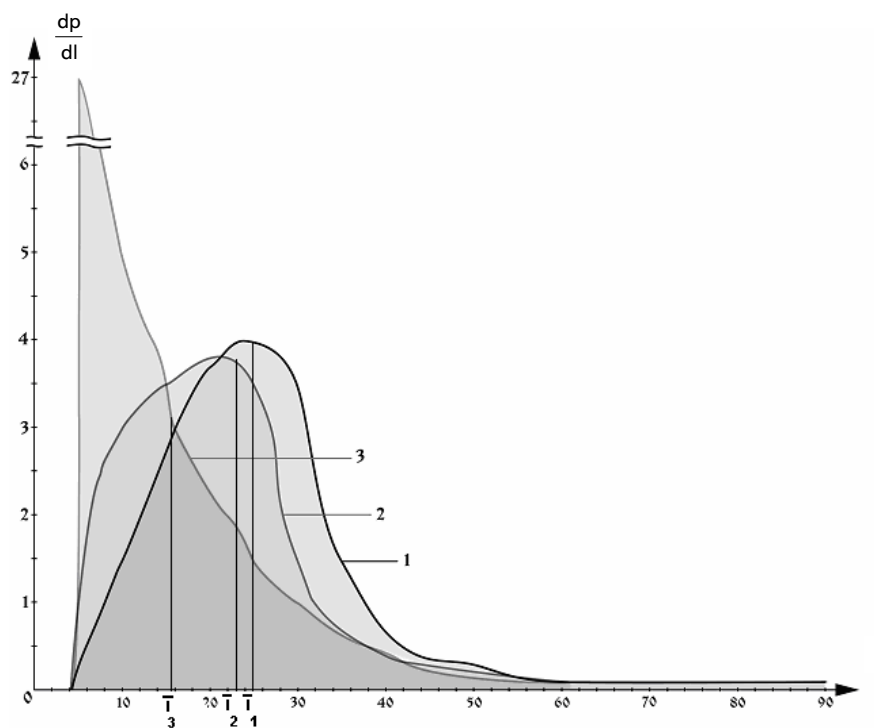


Рис. 4. Кривые плотности распределения атипичных форм трихомонад по размерам для различных временных интервалов действия антисептического препарата мирамистин:

- 1 — при отсутствии действия антисептика (контроль); 2 — при действии антисептика, $t = 30$ мин;
3 — при действии антисептика, $t = 3$ ч,

$\frac{dp}{dl}$ — плотность распределения, l — размер (мкм)

Таблица 2. Количественное соотношение атипичных форм *Trichomonas vaginalis* для различных временных интервалов действия препарата мирамистин

Интервал размеров L (мкм)	Культура без препарата (контроль)				Культура + препарат, t = 30 мин				Культура + препарат, t = 3 ч			
	Кол-во клеток	% соотношен.	L ср.	E %	Кол-во клеток	% соотношен.	L ср.	E %	Кол-во клеток	% соотношен.	L ср.	E %
4,1–9,8	26	8,0	5,7 ± 0,39	20	68	21,0	5,1 ± 0,20	12	168	51,9	5,3 ± 0,12	8
9,8–15,6	27	8,3	11,6 ± 0,22	20	23	7,1	12,0 ± 0,15	20	23	7,1	11,9 ± 0,26	20
15,6–21,3	88	27,2	19,3 ± 0,21	11	82	25,3	19,7 ± 0,18	11	23	7,1	19,4 ± 0,37	20
21,3–27,0	57	17,6	24,5 ± 0,11	13	24	7,4	24,7 ± 0,10	20	21	6,5	24,5 ± 0,17	22
27,0–32,8	88	27,2	30,4 ± 0,21	11	87	26,9	30,1 ± 0,21	11	60	18,5	30,3 ± 0,26	13
32,8–38,5	11	3,4	36,7 ± 0,19	30	13	4,0	36,7 ± 0,16	28	13	4,0	36,7 ± 0,16	28
38,5–44,2	11	3,4	40,8 ± 0,19	30	13	4,0	40,8 ± 0,16	28	13	4,0	40,8 ± 0,16	28
44,2–50,0	5	1,6			5	1,6			1	0,3		
50,0–55,8	2	0,6			3	0,9			1	0,3		
55,8–61,5	3	0,9			2	0,6			1	0,3		
61,5–67,2	1	0,3			1	0,3			0	0		
67,2–72,9	0	0			0	0			0	0		
72,9–78,7	3	0,9			1	0,3			0	0		
78,7–84,4	1	0,3			1	0,3			0	0		
84,4–90,2	1	0,3			1	0,3			0	0		
N = 324					N = 324				N = 324			

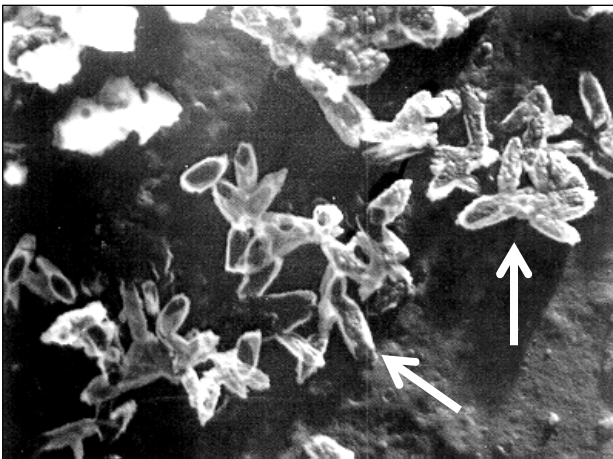


Рис. 5. Прокариоты в культурной среде (обозначены стрелками) (x 9800)

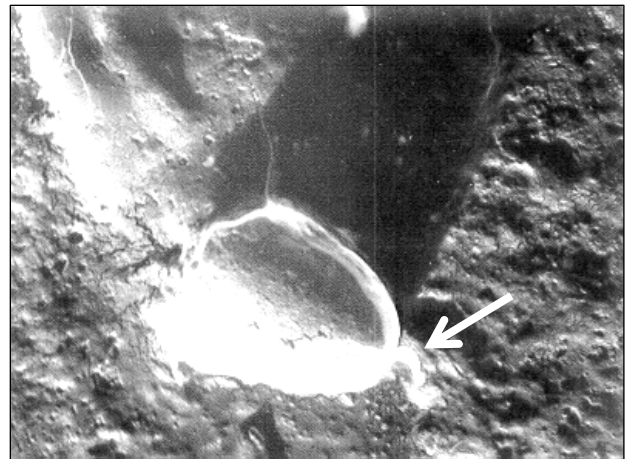


Рис. 6. Жгутиковая (типичная) форма трихомонады (x 9800)

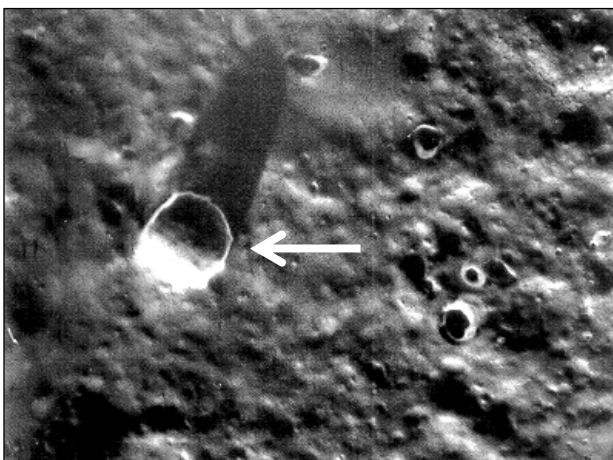


Рис. 7. Мелкая цистоподобная форма трихомонады (x 9800)

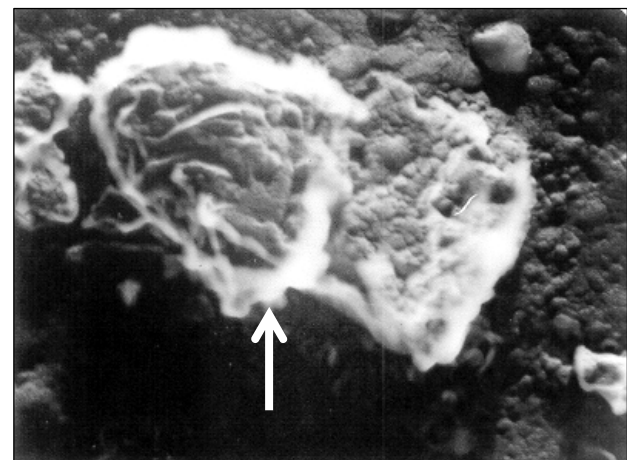


Рис. 8. Амебовидные формы трихомонады (x 12800)

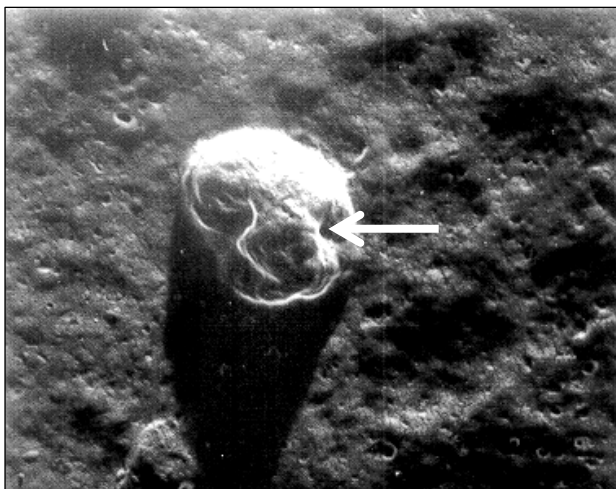


Рис. 9. Овальная форма трихомонады. На поверхности виден жгутиковый карман (клеточный рот) (x 10400)

Анализ распределений с интервалом времени t , равным 30 минутам, показывает усиление асимметрии процесса с возрастанием в 2,6 раза количества мелких форм с размерами от 4,1 до 8,2 мкм. А число форм в интервале от 21,3 до 27 мкм уменьшается в 2 раза ($p < 0,05$). Это является отражением динамики процесса фрагментации, распада и почкования трихомонад, что показывает разнонаправленное действие препарата на атипичные формы возбудителя.

При 3-часовом воздействии мирамистина резко возрастает кластер мелких форм, в основном 4,1 и 8,2 мкм ($p < 0,001$) (рис. 3). Отмечается сравнительно большая устойчивость трихомонад с размерами 27—32,8 мкм. Крупные формы размерами 61,5 мкм и более при 3-часовом воздействии разрушаются.

Посевы опытных проб, выдержанных при 3-часовом и 24-часовом воздействии антисептического препарата, указывают на способность к размножению сохранившейся популяции, причем рост пробы, подвергавшейся 3-часовому воздействию, на пятые сутки культивирования усилился более чем в 2 раза по сравнению с исходным количеством клеток. В пробе, выдержанной 24 часа в экстремальном режиме, наблюдались формы размерами 8,2, 24,6 и 32,8 мкм, которые не размножались, но сохраняли жизнеспособность.

На основании полученных гистограмм выполнен переход к дифференциальному рас-

пределению атипичных форм трихомонад по размерам. Нами разработаны кривые плотности распределения, которые построены по усредненным экспериментальным данным, при этом кривые распределения удовлетворяют условию нормировки на полную вероятность, то есть на 1 (рис. 4). Полученные распределения находятся в удовлетворительном согласии с распределением Максвелла (рис. 4, кривые 1, 2). Различие по критерию согласия экспериментально полученных распределений с теоретическим составляет соответственно 13 и 14%. Распределение для случая действия антисептического препарата в течение 3 часов (рис. 4, кривая 3) существенно отличается от распределения Максвелла и описывается экспоненциальным законом с характерной константой ($K = 0,09$). В случае экспоненциального закона характерный резкий спад распределения указывает на малую жизнеспособность крупных форм трихомонад. Таким образом, с увеличением времени действия антисептика общая закономерность изменения проявляется в смещении кривой плотности распределения в сторону более мелких форм простейших.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе полученных данных установлено, что при действии антисептического препарата мирамистин на атипичные формы трихомонад происходит не только разрушение части клеток сообщества, но и адаптивная перестройка популяции. Последнее состоит в появлении большого числа мелких сферических форм размером 4,1 мкм и гранулярных образований (2 мкм), имеющих наименьшую площадь поверхности, что и определяет их высокую устойчивость к поверхностно-активному веществу.

Таким образом, проведенное исследование отражает механизмы устойчивости атипичных форм трихомонад к лекарственным препаратам и объясняет недостаточную эффективность профилактики и лечения трихомониаза с использованием современного антисептического препарата мирамистина. Данное исследование может способствовать разработке и обоснованию новых средств и методов профилактики ИППП и лечения трихомониаза с учетом морфологической формы возбудителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдумаликов Р.М., Брагина Е.С. Изучение действия комплексного соединения метронидазол-кобальт на влагалищные трихомонады *in vitro* // Вестн. дерматологии и венерологии. — 1995. — № 5. — С. 22—24.
2. Бриттов В.А. Паразитизм в природе и его роль в охране гомеостаза хозяина // Успехи соврем. биологии. — 1987. — № 104 (1). — С. 32—143.
3. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. — М.: Мастерство, 2001. — 224 с.
4. Иванова-Казас О.М. Бесполое размножение животных. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1977. — С. 240.
5. Клименко Б.В. и др. Трихомониаз мужчин, женщин и детей. — СПб.: Сюжет, 2001. — С. 192.
6. Козлюк А.С., Козлюк В.А. Цитоморфологическая диагностика урогенитального трихомониаза // Инфекции, передаваемые половым путем. — 2001. — № 6. — С. 26—29.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с.
8. Мир лекарств. — М.: РЛС—Пациент, 2001. — С. 424—430.
9. Михайлов А.В., Гасанова Т.А. Распространенность урогенитального трихомониаза и особенности его лабораторной диагностики у женщин с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза // Инфекции, передаваемые половым путем. — 2000. — № 2. — С. 26—29.
10. Молочков В.А. Урогенитальный трихомониаз и ассоциированные уретрогенные инфекции (эпидемиология, клиника, диагностика, лечение, профилактика) // Рос. журн. кожных и венерических болезней. — 2000. — № 3. — С. 48—45.
11. Овчинников Н.М., Делекторский В.В. Современное представление о морфологии и некоторых биологических свойствах влагалищной трихомонады // Вестн. дерматологии и венерологии. — 1975. — № 8. — С. 50—54.
12. Рубальский О.В., Калинин Ю.Т., Афанасьев А.А. и др. Исследование воздействия иммунобиологических препаратов на трихомонады *in vitro* // Микробиология, эпидемиология и иммунология. — 1998. — № 3. — С. 81—82.
13. Рубальский О.В., Калинин Ю.Т., Афанасьев А.А. и др. Противотрихомонадная активность метронидазола в присутствии иммунобиологических препаратов // Микробиология, эпидемиология и иммунология. — 1998. — № 5. — С. 67—70.
14. Рубинов Г.Е., Минаева Н.З., Макарова Н.Ю. Антимикробная и противотрихомонадная активность новых лекарственных средств из группы производных 5-нитроимидазола // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 1997. — № 1. — С. 54—56.
15. Саиед Фахер. Применение антисептика мирамистина для индивидуальной профилактики и лечения некоторых венерических болезней: Дис. ... канд. мед. наук. — Симферополь, 1991. — 110 с.

Поступила 21.02.2006 г.