

ХИМИОТЕРАПИЯ

Г. М. Пароникян

К методике изучения трихомонадоцидных соединений *in vitro* и *in vivo*

В настоящее время не существует единой, общепринятой методики испытания и критерия оценки активности испытуемых соединений. Существующие способы испытания не полностью выявляют терапевтические возможности испытуемых препаратов.

Данное исследование мы предприняли с целью выработать такие методы испытания протистоцидных препаратов, которые были бы легко осуществимы и можно было бы в полной мере выявить трихомонадоцидные свойства у новых химиотерапевтических соединений.

Методы отбора активных препаратов *in vitro*

Протистоцидное действие испытуемых соединений *in vitro* нами изучалось двумя методами: методом висячей капли и методом серийных разведений в пробирке.

Первоначальный отбор препаратов нами проводился в висячей капле следующим образом: на покровные стекла наносились равные капли различных разведений испытуемого препарата от 1 : 1000 и выше в физиологическом растворе. В каждую каплю вносилась одна петля взвеси чистой культуры *Trichomonas vaginalis*, культивируемая на приготовленной нами среде № 2. Для работы применялись молодые флягеллаты из культуры 2—3-дневного возраста. Покровное стекло покрывалось предметным с луночкой, края которой смазывались вазелином. В приготовленных таким образом висячих каплях находилось в среднем 4—5 трихомонад в поле зрения микроскопа (600х). Контролем служила взвесь трихомонад в физиологическом растворе. Подопытные и контрольные висячие капли помещались во влажную камеру и переносились в термостат при температуре 37°. В качестве влажной камеры мы применяли чашки Петри, на дне которых находилась увлажненная фильтровальная бумага или марля.

Результаты действия испытуемого препарата на трихомонады учитывались непосредственным наблюдением под микроскопом по распаду тела или полной остановке подвижности всех флягеллат в 25 полях зрения при большом увеличении микроскопа.

Микроскопирование производилось сразу же после постановки опыта и в дальнейшем повторялось через 10, 30 минут, 1, 4, 8 и 24 часа. В

контрольных висячих каплях, как правило, трихомонады жили свыше 24 часов.

Отобранные методом висячей капли активные препараты в дальнейшем испытывались в пробирке, методом серийных разведений. В стерильные пробирки разливалось по 9,5 мл различных разведений препарата, припотоженных на среде № 2, содержащей 20% человеческой сыворотки. В каждую пробирку вносилось по 0,5 мл чистой 48-часовой культуры *T. vaginalis*, содержащей 1 000 000 активных особей, подсчитанных гемоцитометром. Контролем служила взвесь трихомонад на питательной среде без препарата. Подопытные и контрольные пробирки помещались в термостат при температуре 37°.

Окончательный результат действия препарата на флягеллят учитывался через 72 часа после начала опыта. Из каждой пробирки брались пробы и микроскопировались. Из тех пробирок, где отсутствовали подвижные трихомонады, производились посевы на нормальную среду для проверки жизнеспособности простейших.

Результаты испытания препаратов *in vitro* двумя методами в основном совпадают между собой. Наблюдаемое снижение активности у части препаратов, при испытании методом серийных разведений, объясняется действием белка сыворотки и различных протеннов, входящих в состав культуральной среды.

Протистоцидное действие испытуемых соединений сравнивалось с осарсолом, широко применяемым в настоящее время в клинике при лечении трихомонадной инфекции [1, 2].

Испытание осарсола проводилось в тех же условиях как и все остальные препараты.

Испытание препаратов *in vitro* проводилось и на культуре трихомонад, содержащих сопутствующую бактериальную флору. На нативной среде (секрет влагалища), содержащей в большом количестве активные трихомонады, испытание препаратов проводилось только методом висячей капли. А в тех случаях, когда для опыта простейшие брались из среды Е. А. Павловой [3], испытание проводилось вышеуказанными двумя методами.

Описанными выше методами нами было испытано более 1000 веществ, относящихся к самым различным группам органических соединений, синтезированных в Лаборатории фармацевтической химии Академии наук Армянской ССР под руководством проф. А. Л. Мнджояна в течение последних нескольких лет.

Из числа испытанных соединений нами было отобрано большое число активных препаратов, многие из которых в дальнейшем изучались *in vivo*.

Методика испытания препаратов *in vivo*

Общеизвестно, что испытание препаратов *in vitro* не может дать полного представления об эффективности того или иного химиотерапевтического средства. Для полной и правильной характеристики действия пре-

парата его исследование необходимо проводить на животных. Опыты *in vivo* значительно приближают нас к результатам, получаемым в клинике.

Не найдя в литературе описания вполне пригодной химиотерапевтической модели экспериментальной инфекции, вызванной чистой культурой *T. vaginalis*, для изучения препаратов *in vivo* мы использовали нашу экспериментальную модель трихомонадной инфекции человека на белых мышах [4].

Методика испытания *in vivo* заключается в следующем: в опыт брались 3 группы мышей по 10 в каждой группе, одинаковых по весу и возрасту. Взвесь 2—3-дневной чистой культуры *T. vaginalis* на среде № 2 в объеме 0,5 мл, содержащая 125 000 активных флягеллят, вводилась подкожно в область живота мышам первой группы. Лечение мышей препаратом начиналось спустя 6 часов после заражения и проводилось в дальнейшем один раз в сутки в течение 4 дней. Мышам подкожно, в абсцесс, образовавшийся на месте введения культуры, вводилось по 0,5 мл раствора препарата, приготовленного на физиологическом растворе. Второй группе мышей вводилась только культура (контроль инфекции), третьей группе только препарат.

Критерием активности препарата считалось исчезновение подвижных трихомонад из абсцесса на следующий день после окончания лечения. Для выяснения этого трихомонадный абсцесс вскрывается и содержимое его микроскопируется в свежих неокрашенных препаратах. В случае отсутствия подвижных трихомонад в абсцессе, из него делается высеv материала на свежую среду, для определения жизнеспособности флягеллят.

В большинстве случаев об активности испытуемых препаратов можно судить и по внешнему виду абсцесса у леченых мышей. Если в область еще не образовавшегося абсцесса вводится заведомо неактивный препарат, трихомонадный абсцесс появляется, постепенно увеличивается до максимума и вскрывается. В содержимом абсцесса обнаруживаются активные трихомонады. При лечении же мышей активным препаратом, в зависимости от его силы, трихомонадный абсцесс либо вовсе не развивается, либо появляется небольшой абсцесс, который не вскрывается и в его содержимом активных трихомонад не обнаруживается.

При подборе дозы культуры трихомонад для воспроизведения модели и при лечении трихомонадных абсцессов на белых мышах мы исходили из результатов испытания активных препаратов в клинических условиях, как, например, осарсола и аминарсона [5]. Результаты опытов приведены в таблице.

Из данных таблицы видно, что соединения, содержащие мышьяк: осарсол и аминарсон, взятые в максимально переносимых для мышей дозах, оказались высоко активными лишь при заражающей дозе в 125 000 флягеллят, при дозе же 250 000 они были менее активны. При более высоких дозах инфекционного материала эти препараты оказались не активными. Испытанный при этих условиях высоко активный *in vitro* препарат № 72 из группы производных бензойной кислоты в дозе в 4—5 раз мень-

Таблица

Препараты	Доза мг/мышь		интервал между зараж. и лечением	количество мы- шей в группе	Заражающая доза <i>T. vaginalis</i> (штамм 31)					
	разовая	суммарная			31250	62500	125 т.	250 т.	500 т.	1 млн.
					У скольких из них обнаружены ак- тивные трихомонады в абсцессе после лечения					
Осарсол	4	16	6	10	0	0	0	2	10	10
Аминпарсон	5	20	6	10	0	0	0	2	8	10
№ 72	1	4	6	10	0	0	0	0	0	6
№ 6	1	4	10	10	10	10	10	10	10	10
контроль (не леченые)	—	—	—	10	10	10	10	10	10	10

шей, чем осарсол или аминпарсон, оказался высокоактивным. Для сравнения в опыт был взят препарат № 6 из той же группы, но не активный *in vitro*. Последний, как и следовало ожидать, оказался не активным даже при инфицирующей дозе трихомонад равной 31 250. В контрольной группе мышей (не леченых) активные трихомонады в абсцессе были обнаружены в 100% случаев.

Таким образом, данные полученные при испытании осарсола и аминпарсона, дают нам основание считать, что максимальной дозой инфекционного материала для воспроизведения трихомонадной инфекции на мышах, пригодной для первоначального отбора активных *in vivo* препаратов, может служить 125 000 активных трихомонад.

Чтобы выяснить, когда лучше начинать лечение инфицированных мышей, был поставлен новый опыт. На этот раз лечение животных началось не через 6 часов после постановки опыта, а спустя 24 часа. Опыты проводились в тех же условиях, в каких проводились опыты при лечении мышей через 6 часов после инфицирования.

Было найдено, что если лечение зараженных мышей начинается на следующий день после постановки опыта, т. е., когда в образовавшемся абсцессе число активных трихомонад заметно увеличивается, активность испытуемых соединений (даже активных в клинике) резко снижается. Получаются не совсем четкие результаты, по которым, естественно, трудно судить о достоинствах препарата, а тем более если при этих условиях будет проводится первоначальный отбор для выявления активных соединений. Таким образом, полученные результаты ясно показывают, что для предварительного отбора активных *in vivo* препаратов лечение мышей лучше всего начинать спустя 6 часов после их заражения.

В тех случаях, когда необходимо в полной мере выявить лечебные возможности активного препарата, испытания проводятся повторно, в более тяжелых условиях. На этот раз лечение мышей начинается спустя 24 часа после заражения, увеличивается заражающая доза культуры

T. vaginalis (которая иногда доводится до одного миллиона трихомонад на мышь).

Опытным путем было также установлено, что активные в клинике при лечении трихомонадного кольпита препараты, содержащие мышьяк: осарсол и аминарсон, оказались активными на химиотерапевтической модели только при введении подкожно на месте введения инфекционного материала. По этой причине мы стали применять подкожный путь введения испытуемых препаратов.

Наши попытки проводить испытания препаратов *in vivo* на экспериментальной модели трихомонадной инфекции, полученной смешанной культурой трихомонад, оказались безуспешными. Ввиду присутствия в абсцессах бактерий заметно усиливается воспалительный процесс, образование и вскрытие абсцесса происходит раньше обычного. Все это затушевывает картину инфекции, мешает проводить полный курс лечения инфицированных животных, а следовательно, дать правильную оценку испытуемому препарату.

На разработанной нами химиотерапевтической модели трихомонадной инфекции было изучено более 50 активных *in vitro* соединений, синтезированных в нашей лаборатории. Нами был найден ряд высокоактивных *in vivo* соединений, из которых три препарата были предложены для испытания в клинике при лечении трихомонадного кольпита.

В ы в о д ы

На основании полученных нами экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. Для отбора активных трихомонадоцидных соединений целесообразно испытания химиотерапевтических препаратов *in vitro* проводить двумя методами: в височей капле — для предварительного отбора активных соединений и методом серийных разведений — для более детального изучения активных препаратов.

2. Разработанная нами экспериментальная химиотерапевтическая модель трихомонадной инфекции (*T. vaginalis*) на белых мышах пригодна для проведения испытания химиотерапевтических препаратов *in vivo*. Эта модель является надежной, простой, легко осуществимой и удовлетворяет требованиям, обычно предъявляемым к модели экспериментальной инфекции.

Лаборатория фармацевтической химии

Академии наук Армянской ССР

Поступило 11 XII 1954 г.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Борнштейн С. А. Акушерство и гинекологическая практика, 166—167, Киев, 1952.
 2. Лимар Ц. Р. Акушерство и гинекология, 2, 67—68, 1940.
 3. Павлова Е. А. Медицинская паразитология и паразитарные болезни, 7, 2, 224—227, 1938.
 4. Пароникян Г. М. Доклады Академии наук АрмССР, том XVI, 3, 91—96, 1953.
 5. Jiroves O. a³ Peter R. Bull. Soc. Pathol. exotique, vol. 42, 5/6, 148—151, 1949.
- Известия VIII, № 12—7

Գ. Մ. Պարոնիկյան

ՏՐԻԽՈՄՈՆԱԴՈՅԻԴ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ in vitro ԵՎ in vivo
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՄԵԹՈԴԻԿԱՅԻ ՇՈՒՐՋԸ

Ա Մ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Տվյալ աշխատանքի նպատակն է՝ մշակել պրոտիսոոցիդ պրեպարատների ուսումնասիրության այնպիսի մեթոդներ, որոնք լինեն իրագործելի և հնարավորություն տան հայտնաբերելու նոր քիմիաթերապևտիկ միացությունների տրիսոմոնադոցիդ հատկությունները:

Ստացած փորձնական տվյալները մեզ հիմք են տալիս անելու հետևյալ եզրակացությունները.

1. Ակտիվ տրիսոմոնադոցիդ միացություններ հայտնաբերելու համար նպատակահարմար է քիմիաթերապևտիկ պրեպարատների ուսումնասիրությունը in vitro կատարել երկու մեթոդով՝ «կախված կաթիլի մեջ»՝ ակտիվ միացությունների նախնական ընտրության համար, և «հաջորդական լուծումների» մեթոդով՝ ակտիվ պրեպարատների ավելի մանրամասն ուսումնասիրության համար:

2. Տրիսոմոնադ ինֆեկցիայի (*Trichomonas vaginalis*) մեր կողմից մշակված փորձնական մոդելը սպիտակ մկների վրա պիտանի է քիմիաթերապևտիկ պրեպարատների in vivo ուսումնասիրման համար: Այս մոդելը ճիշտ է, պարզ է, հեշտ իրագործվող և բավարարում է փորձնական ինֆեկցիայի մոդելներին ներկայացված բոլոր պահանջներին: