

## BADANIA NAD WRAŻLIWOŚCIĄ *TRICHOMONAS HOMINIS* NA CZYNNIKI ABIOTYCZNE.

### I. WSTĘPNA OCENA PRZEŻYWAŁNOŚCI WICIOWCÓW W WYBRANYCH MEDIACH W WARUNKACH *IN VITRO*

LIDIA CHOMICZ<sup>1</sup>, JUSTYNA ŻEBROWSKA<sup>1</sup>, PAWEŁ ZAWADZKI<sup>2</sup>,  
PRZEMYSŁAW MYJAK<sup>3</sup>, KONRAD PERKOWSKI<sup>4</sup>, HENRYK REBANDEL<sup>5</sup>  
I ZYGMUNT KAZIMIERCZUK<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Medycznej, Akademia Medyczna w Warszawie, ul. Nowogrodzka 73, 02-018 Warszawa; <sup>2</sup>II Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Akademia Medyczna w Warszawie, ul. Lindleya 4, 02-005 Warszawa; <sup>3</sup>Zakład Parazytologii Tropikalnej, Akademia Medyczna w Gdańsku, Powstania Styczniowego 9b, 081-519 Gdynia; <sup>4</sup>Zakład Ortodoncji, Akademia Medyczna w Warszawie, ul. Nowogrodzka 59, 02-006 Warszawa; <sup>5</sup>Pracownia Dydaktyki i Efektów Kształcenia, Akademia Medyczna w Warszawie, ul. Oczki 4, 02-00.4 Warszawa; <sup>6</sup>Laboratorium Farmakologii Eksperymentalnej PAN Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; <sup>7</sup>Instytut Chemii SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

**ABSTRACT.** Studies on the susceptibility of *Trichomonas hominis* to some abiotic factors. I. Preliminary assessment of antitrichomonal activity of selected compounds *in vitro*. The flagellate *Trichomonas hominis* is often identified in human diarrheic stools. Because of the fecal-oral transmission rout, infection with *T. hominis* is more frequently reported in children than in adults. Although infections with the trichomonads in some world regions are as often as with *Giardia*, no prevention and optimal treatment are defined. The purpose of our *in vitro* studies was to examine susceptibility of *T. hominis* to a newly synthesized imidazole derivative – 1-metylo-2-(2,4-dinitrobenzylotio)-1H-imidazol – P27; in order to make a comparison between this new and previously known compounds, chlorhexidine and metronidazole were used. The protozoans derived from the diarrheic stool of adult patient were grown on the liquid Pahm medium and subcultured twice a week. Assays of trichomonad cultures were incubated with one of the following substances: chlorhexidine, metronidazole or P27. For each compound, two different concentrations were applied. After 24h exposition, an antitrichomonal effect of the above substances was assessed, namely a quantity of the surviving trichomonads was microscopically determined and compared with that observed in control cultures. The protozoans showed different susceptibility, depending on kind and concentration of tested compound. In comparison to the control cultures, the reduction in number of surviving protozoans appeared in the assays with metronidazole, chlorhexidine and P27 (to 63%, 52% and 8.7%, respectively). The highest *in vitro* susceptibility of *T. hominis* was revealed to a new imidazole derivative P27. The obtained results allow us to suppose that the further studies in this field will be very helpful for explaining the mechanisms of the antitrichomonal activity of the tested compounds as well as for assessment of the influence of various abiotic factors.

**Key words:** chlorhexidine, metronidazole, P27, susceptibility *in vitro*, *Trichomonas hominis*.

## WSTĘP

*Trichomonas hominis* jest kosmopolitycznym pierwotniakiem, występującym w postaci trofozoitu, izolowanym często z kału pacjentów z biegunką czy z przewlekłym nieżytem jelita grubego. Warunki klimatyczne, a także socjalno-ekonomiczne sprawiają, że infekcje z udziałem rzęsistka jelitowego częściej stwierdzane są w strefie subtropikalnej i tropikalnej. *T. hominis* zasiedla końcowy odcinek jelita cienkiego oraz jelito grube człowieka. Chociaż inwazje tego rzęsistka opisano u osób w różnym wieku (Ogunba 1977), w związku z fekalno-oralną drogą zarażenia stwierdzane są częściej u dzieci niż u dorosłych (Chunge i wsp. 1989, Okafor i Azubike 1992, Garcia 2001). Kilkudniowe, a nawet kilkutygodniowe, wyniszczające biegunki z udziałem *T. hominis* występują u noworodków, u których może być skuteczne leczenie furazolidonem (Mancilla-Ramirez i Gonzalez-Yunes 1989). Zараżenie *T. hominis* właśnie u noworodków i niemowląt może stanowić poważny problem medyczny ze względu na niewykształconą jeszcze odporność (Chunge i wsp. 1989); nie można także lekceważyć potencjalnego zagrożenia zdrowia dorosłych, wśród których szczególnie narażone są osoby z upośledzeniem odporności różnego pochodzenia (wrodzonym, nabytym, spowodowanym terapeutyczną immunosupresją w chorobie nowotworowej, przy transplantacji narządów itp.). Znanne są objawowe przypadki występowania mieszanych inwazji jelitowych, w których – obok innych pasożytniczych pierwotniaków czy helmintów – wykrywano *T. hominis* (Ogunba 1977, Chunge i wsp. 1989). Opisany został również rzadki przypadek inwazji mieszanej u pacjenta z perforacją wrzodu podwątrobowego: w jego treści stwierdzono obecność rzęsistka policzkowego *T. tenax* – pasożyta jamy ustnej – oraz rzęsistka jelitowego *T. hominis* (Jacobsen i wsp. 1987). Z dotychczasowych skąpych danych wynika, że niektóre szczepy *Trichomonas hominis* mogą wykazywać większą wytrzymałość na działanie czynników abiotycznych środowiska zewnętrznego niż inne gatunki rzęsistków, bytujących u człowieka (Kurnatowska 1999).

Koncepcja niepatogeniczności tego rzęsistka, przyjęta pochopnie pomimo istnienia licznych dowodów o roli *T. hominis* jako czynnika etiologicznego przewlekłych biegunek, w znacznej mierze tłumaczy brak konsekwentnych badań nad tym wiciowcem. Zараżenia przez *T. hominis* są prawdopodobnie częstsze niż przez *Giardia intestinalis* (Garcia 2001), jednak ani profilaktyka ani wybiórcze leczenie dotąd nie zostały opracowane. Celem naszych badań była wstępna ocena ewentualnych zmian w przeżywalności *T. hominis*, związanych z oddziaływaniem *in vitro* wybranych związków chemicznych, w tym nowej pochodnej imidazolowej o potencjalnym działaniu rzęsistkobójczym.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła hodowla rzęsiątka jelitowego *T. hominis*, izolowanego z kału pacjenta z biegunką, utrzymywana w 15ml probówkach na pożywce Pahm (Myjak 1974) w inkubatorze biologicznym w temperaturze 37°C. 2 razy w tygodniu rzęsiątka przeszczepiano na świeże podłoże, przy czym oceniano mikroskopowo ruchliwość i wygląd wiciowców. Kultury te stanowiły materiał kontrolny oraz wyjściowy do prowadzenia prób *in vitro* nad wrażliwością rzęsiątek na substancje czynne. Do 1ml próbek hodowli wyjściowych wprowadzano jedną z trzech substancji czynnych: wodny roztwór chlorheksydyny (oznaczony jako CHX), 2-metylo-5-nitro-1H-imidazolo-1-etanol t.j. metronidazol (MNZ) w roztworze dimetylosulfotlenku (DMSO) lub nowo zsyntetyzowaną pochodną imidazolową – 1-metylo-2-(2,4-dinitrobenzylotio)-1H-imidazol (P27) w roztworze DMSO. Równolegle badano próbki kontrolne: (a) bez substancji czynnych oraz (b) z dodatkiem rozpuszczalników, co pozwoliło dobrać takie ich stężenia, które nie zaburzały rozwoju rzęsiątek, czego wykładnikiem była liczba i stan pierwotniaków zbliżone do tych w kulturze kontrolnej. Próby wykonywano dla dwóch różnych stężeń każdej z 3 substancji. Ocena stanu rzęsiątek dokonywana była mikroskopowo, z użyciem komory Bürckera, po 24 godzinach inkubacji z poszczególnymi substancjami, trzykrotnie z każdej próbki, w przeliczeniu na 1ml. Oceniano wpływ substancji badanej na liczbę pierwotniaków, porównując ją z danymi uzyskanymi z próbek kontrolnych.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki, uzyskane z poszczególnych próbek testowych i kontrolnych po 24 godzinnej inkubacji, wskazywały na wyraźne różnice w przeżywalności *T. hominis* w hodowlach testowych w porównaniu z kontrolnymi, pojawiające się pod wpływem działania *in vitro* wybranych związków chemicznych o potencjalnych właściwościach przeciwrzęsiątkowych. Analiza porównawcza danych, dotyczących wpływu poszczególnych testowanych substancji wykazała, że liczba żywych rzęsiątek w przeliczeniu na 1ml hodowli była wyraźnie zależna zarówno od rodzaju zastosowanego preparatu jak i jego stężenia.

W naszych badaniach użyta została substancja antyseptyczna, stosowana w profilaktyce i chirurgii, w której substancję czynną stanowi dwuglukonian chlorheksydyny. Charakteryzuje się ona znaczną aktywnością bakteriostatyczną, jest używana m. innymi do odkażania rąk i pola operacyjnego przed zabiegami i podczas nich. W naszych wcześniejszych badaniach, prowadzonych także *in vitro* (Chomicz i wsp. 2003), substancja ta wykazywała wyraźne antyamebowe działanie przeciw szczepowi Neff *Acanthamoeba castellanii*. Kolejny użyty w naszych badaniach preparat, metronidazol, łatwo wnika do jednokomórkowych organizmów, w których oddziałuje selektywnie cytotoksycznie (Edwards 1980); stosowany jest ze skutkiem pozytywnym w leczeniu zakażeń wewnątrzjelitowych, hamuje rozwój

*Entamoeba histolytica*, pełzaka czerwonej. Metronidazol jest lekiem z wyboru, stosowanym w leczeniu zakażeń, wywoływanych przez rzęśistka pochwowego *Trichomonas vaginalis* i zalecanym także przeciw *T. hominis*. Preparat ten może wywoływać jednak także niepożądane objawy w postaci zaburzeń ze strony układu pokarmowego oraz nadwrażliwości na etanol. Wymienione wyżej substancje zostały użyte w stężeniach, stosowanych wcześniej w warunkach *in vitro* (Niszl i Markus 2001, Chomicz i wsp. 2003, Kopańska i wsp. 2004). Dwuglukonian chlorheksydyny wywierał wyraźny redukujący wpływ na liczbę rzęśistków. W próbkach, w których substancję tę zastosowano w stężeniu 10 µg/ml, średnia liczba tych wiciowców stanowiła 52,1% liczby tych pierwotniaków w próbkach kontrolnych. Metronidazol oddziaływał różnie w zależności od zastosowanego stężenia: w próbkach, do których dodany został w relatywnie niskim stężeniu, stwierdzano większą liczbę pierwotniaków niż w kontrolnych, podczas, gdy jego dwukrotnie wyższe stężenie powodowało obniżenie liczby wiciowców do 63%. Interesujące były wyniki prób z nowym preparatem P27: w próbkach, w których zastosowano najwyższe stężenie tej substancji, po 24godzinnej inkubacji ogólna liczba rzęśistków była dziesięciokrotnie mniejsza niż w kontrolnych.

Tabela 1. Liczba rzęśistków w zależności od rodzaju i stężenia dodanej substancji

Rodzaj dodanej substancji	Stężenie dodanej substancji [µg/ml]	Rodzaj roztworu	Średnia liczba żywych rzęśistków x 10 <sup>3</sup>	% żywych rzęśistków w stosunku do kontroli
CHX	4,0	H <sub>2</sub> O	206,67	96,0
	10,0	H <sub>2</sub> O	112,22	52,1
MNZ	4,0	DMSO	422,89	196,6
	8,0	DMSO	135,83	63,1
P27	17,3	DMSO	118,15	54,9
	52,0	DMSO	18,89	8,7
C	–	–	215,0	100,0

Objaśnienia: CHX – chlorheksydyna (Chlorhexidine), MNZ – metronidazol (Metronidazole), P27 – 1-metylo-2-(2,4-dinitrobenzylotio)-1H-imidazol, DMSO – dimetylosulfotlenek (dimethyl sulfoxide), C – kontrola

Wyniki mikroskopowej oceny przeżywalności rzęśistków po 24 godzinach inkubacji z poszczególnymi substancjami w zależności od ich rodzaju i zastosowanego stężenia, w przeliczeniu na 1ml hodowli, w porównaniu z danymi uzyskanymi z próbek kontrolnych przedstawiono w Tabeli 1. Porównawcza analiza tych wyników wskazuje, że rzęśistki z badanej przez nas hodowli *in vitro*, pochodzące wyjściowo z zarażenia naturalnego, wykazują dużą wrażliwość na dwuglukonian chlorheksydyny, większą niż na metronidazol. Co więcej, okazuje się, że niskie stężenie metronidazolu może stymulować rozmnażanie się tych pierwotniaków. Wiciowce te okazały się natomiast bardzo wrażliwe na nową pochodną imidazolową P27 w roz-

tworze DMSO. Substancja ta w obydwu zastosowanych stężeniach wyraźnie hamowała rozwój pierwotniaków. Szczególnie silne rzęsistkobójcze działanie ujawniło się w próbkach o wysokim stężeniu tej nowo zsyntetyzowanej pochodnej imidazolowej, jednak ograniczone warunki niniejszych badań nie pozwalają na ocenę stopnia trwałości uzyskanego efektu. Przedstawione wyniki naszych wstępnych badań są nader obiecujące. Stanowią one uzasadnienie dalszych poszukiwań, w których należy uwzględnić większą różnorodność testowanych substancji oraz zróżnicowanie stosowanych stężeń. Dla lepszego zrozumienia dynamiki wrażliwości rzęsistków na badane preparaty konieczne wydaje się uwzględnienie zmiennego wpływu innych parametrów fizykochemicznych, oddziałujących na populacje *T. hominis* w warunkach *in vitro*, a nie wziętych pod uwagę w niniejszych wstępnych badaniach. Zróżnicowanie czasu ekspozycji pierwotniaków na działanie substancji czynnych może dostarczyć istotnych danych, niezbędnych dla uzyskania trwałego długofalowego efektu.

#### LITERATURA

- Chomicz L., Żebrowska J., Starościak B., Piekarczyk J., Fiedor P., Zawadzki P., Mazurkiewicz M., Konopka M. 2003. Badania nad amfizoicznymi amebami pierwotnie wolnożyjącymi – biotyczne i abiotyczne uwarunkowania zagrożeń dla ludzkiego zdrowia. *Medycyna, Dydaktyka, Wychowanie* 9: 34-39.
- Chunge R.N., Wamola I.A., Kinoti S.N., Muttunga J., Mutanda L.N., Nagelkerke N., Muthami L., Muniu E., Simwa J.M., Karumba P.N. 1989. Mixed infections in childhood diarrhoea: results of a community study in Kiambu District, Kenya. *East African Medical Journal* 66: 715-23.
- Edwards D.I. 1980. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *British Journal of Venereal Diseases* 56: 285-290.
- Garcia L.S. 2001. Diagnostic medical parasitology, ASM PRESS, Washington.
- Jacobsen E.B., Friis-Moller A., Friis J. 1987. *Trichomonas* species in a subhepatic abscess. *European Journal of Clinical Microbiology* 6: 296-297.
- Kopańska K. (nee Zastąpiło), Najda A., Żebrowska J., Chomicz L., Piekarczyk J., Myjak P., Bretner M. 2004. Synthesis and activity of 1 H-benzimidazole and 1 H-benzotriazole derivatives as inhibitors of *Acanthamoeba castellanii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12: 2617-2624.
- Kurnatowska A. 1999. Protozoologia lekarska. W: *Zarys parazytologii lekarskiej* (Red. R. Kadłubowski, A. Kurnatowska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Mancilla-Ramirez J., Gonzalez-Yunes R. 1989. Diarrhea associated with *Trichomonas hominis* in a newborn infant. *Boletin Medico del Hospital Infantil de Mexico* 46: 623-625.
- Myjak P. 1974. The use of solid medium cultures for the removal of bacteria and fungi from *Entamoeba histolytica* strains. *Biuletyn Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej* 25: 113-120.
- Niszl I.A., Markus M.B. 2001. Treatment of Acanthamoebic keratitis. *XI International Congress of Protozoology ICOP, Salzburg, Austria, July 15-19, Book of Abstracts*: 75.
- Okafor C.N., Azubike C.N. 1992. Studies in intestinal parasitic disease agents in stools of people in a rural area of Nigeria. *West African Journal of Medicine* 11: 106-11.
- Ogunba E.O. 1977. The prevalence of human intestinal protozoa in Ibadan, Nigeria. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 80: 187-91.