

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Ковальчук М.Т., Шкільна М.І., 2011
УДК 615.281/.283.038

М.Т. Ковальчук, М.І. Шкільна

ОЦІНКА ПРОТИПАРАЗИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ ОРНІДАЗОЛУ

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

Наведено результати протипаразитарної активності орнідазолу. Дається обґрунтування доцільності вдосконалення мікроскопічного паразитологічного аналізу, зокрема на основі люмінесцентних методів дослідження.

Ключові слова: лямблії, орнідазол, протипаразитарна дія, поляризована флуоресценція.

Лямбліоз як поширена протозойна хвороба з властивою багатоваріантністю клінічного перебігу і наслідків залишається актуальною медико-соціальною проблемою, яка потребує подальшого поглибленого вивчення. За пропозицією Міжнародної комісії по зоологічній номенклатурі, збудника називають *Giardia intestinalis* – «жиардія тонкокишкова» [1].

Так, за даними експертів ВООЗ, щорічно у світі лямбліозом заражаються 200 млн людей [2]. Тільки в Україні щорічно реєструють 30-40 тис. випадків лямбліозу [3], а в Тернопільській області – в межах 550-650 випадків [4]. Через різке зниження системи імунного захисту організму хворої людини, наявність супутніх захворювань, обмежений спектр високоефективних і водночас малотоксичних антипротозойних препаратів особливої ваги набуло завдання пошуку шляхів вибору оптимального для конкретного пацієнта лікувального протипаразитарного засобу.

З урахуванням методичної доступності і об'єктивності тестових проб на протипаразитарну активність лікувальних засобів в реакціях *in vitro*, з очевидністю постає доцільність застосування в клініко-лабораторній практиці методу цитолюмінесцентного аналізу, що й стало визначальним при постановці мети роботи, а саме, дослідити протипаразитарну активність орнідазолу за допомогою методу поляризованої флуоресценції.

Оскільки фармакодинамічний ефект орнідазолу пов'язаний з порушенням структури ДНК у чутливих до нього одноклітинних, зокрема, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* (*Giardia intestinalis*), то поляризована флуоресценція набирає важливого значення не

тільки для ідентифікації збудника захворювання, але й низки змін макромолекул нуклеїнових кислот клітини паразита, що виникають внаслідок дії лікувального засобу. Так, з одного боку, орнідазол як α -(хлорометил)-2метил-5-нітроімідазол-1-етанолу (код АТС J01X D03) – сполука імідазолового ряду з характерними анізотропними щодо світла властивостями флуоресціює у поляризованому світлі в силу структуральних особливостей засобу. З іншого боку, з урахуванням аналогічних властивостей ядрових нуклеїнових кислот, а також ліпідів мембран клітини паразитів, вказана особливість відображає вплив молекул протипротозойного засобу на збудника. Цілком очевидно постає методична можливість визначати *in vitro* як вихідний рівень чутливості збудника до лікарського препарату перед проведенням антипаразитарної терапії (з метою вибору оптимального протипротозойного засобу), так і індивідуальної оцінки ефективності наміченого лікування.

У дослідження *in vitro* брали різні розведення орнідазолу, виходячи з притаманних препарату фармакокінетичних властивостей. Оскільки з травного тракту після внутрішнього застосування всмоктується 90 % орнідазолу, оптимальна концентрація активної речовини визначена розробником засобу в межах від 6 до 36 мкг/л включно. З розрахунку на 1 краплю крові (0,05 мл) разову дозу орнідазолу для проведення досліджень *in vitro* взято у розведенні 1:10⁶.

Розведення протипаразитарного засобу готували наступним чином. У 6 мікропробірок попередньо вносили по 0,95 мл дистильованої води. Після цього у першу пробірку добавили 0,05 мл розчину орнідазолу з ампули, перемішували з внесеною дистильованою водою, після чого 0,05 мл отриманого розчину в розведенні 1:10 переносили мікропіпеткою у другу пробірку з водою, отримане у такий спосіб розведення в 1:100 переносили до наступної мікропробірки і т.д., отримуючи ряд послідовних розведень препарату, а саме від 1:10 до 1:10⁶ – включно. Далі готували контрольні мікропрепарати, для чого на чисте

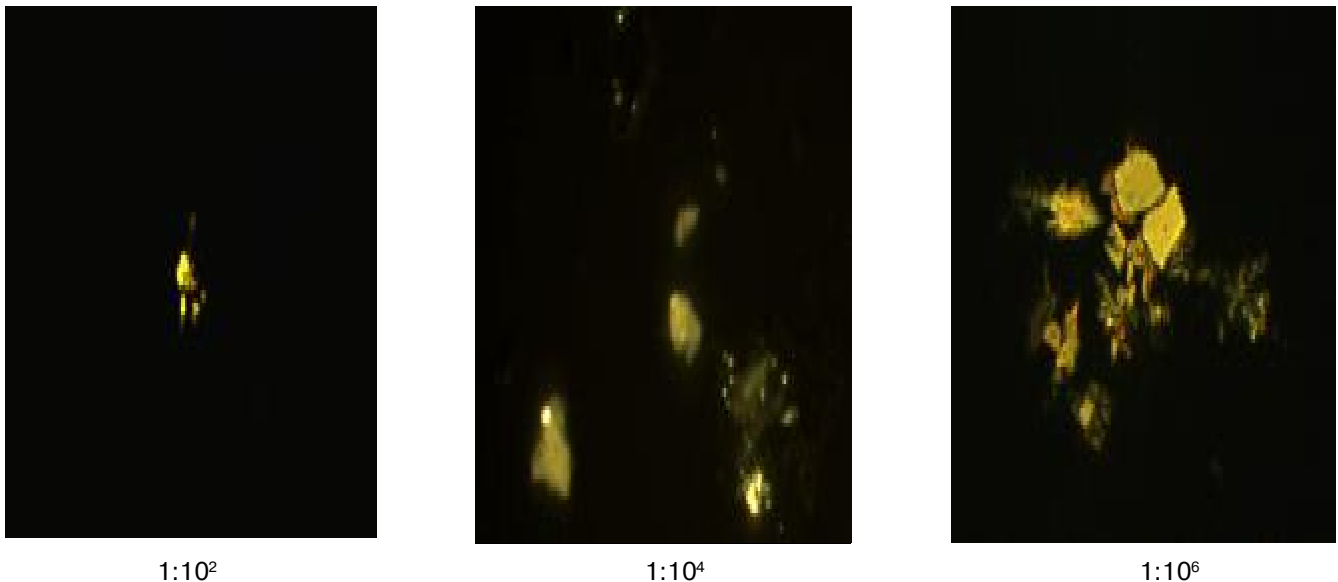
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

знежирене предметне скло наносили мікрокраплини (20 мкл) протипротозойного засобу в кожному з отриманих розведень. Після підсихання препарати досліджували у полі зору поляризаційного мікроскопу, звертаючи увагу на форму, спектр світіння і розміри мікрочастини орнідазолу.

З метою встановлення протипаразитарної дії орнідазолу на лямблій у вказаних вище розведеннях, дослідні мікропрепарати готували наступним чином. На предметному склі 0,05 мл матеріалу від хворого у вигляді випорожнень, дуоденального вмісту змішували з 0,05 мл орнідазолу, взятому в кожному із розведень, витримували упродовж 10 хв. у захищеному від прямого світла місці, накривали скельцем і досліджували в полі зору мікроскопа за методикою поляризаційної флуоресценції. При цьому звертали увагу на форму і розміри збудників, а також спектр та інтенсивність світіння.

Окремо готували контрольні мікропрепарати інтактного (без змішування з орнідазолом) матеріалу від хворого, а також препарати орнідазолу без змішування з біоматеріалом — для виявлення спонтанної кристалізації орнідазолу.

В результаті проведених досліджень встановлено, що деструктивний вплив орнідазолу на одноклітинні паразити мав місце при всіх розведеннях орнідазолу: від 1:100 до 1:1 000 000 (мал. 1). Цей процес вирізнявся тим, наскільки близько або віддалено в мікропрепараті знаходилися клітини лямблій від мікрочастин орнідазолу, а відтак — на якому часовому відрізку відносно процесу кристалізації відбулося ураження клітин молекулами орнідазолу. Загальною характеристикою протипаразитарної дії орнідазолу є те, що останній індукував деструкцію клітини у вигляді цитолізу, дегрануляції ядер, зниження інтенсивності флуоресценції.



Мал. 1. Цитодеструкція та індукована кристалізація лямблій у зішкребку з язика хворого під впливом орнідазолу в різних розведеннях. Поляризована флуоресценція. МС-200:об. х40; ок. х20.

Якщо ж окрема клітина паразита опинялася у безпосередній близькості до центру кристалізації орнідазолу, то фізичний процес кристалізації цієї речовини позначався на формі клітинної деструкції. Клітина при цьому зазнавала фрагментації і набирала зовнішніх ознак мікрочастини за кутністю форм і прямолінійністю границь. Про належність до рідкокристалічних сполук свідчить поліхромність висвічування інгредієнтів реакції

біоорганічної і синтетичної природи. Очевидно, цей феномен є відображенням цитотропного ефекту орнідазолу: спочатку розчинені молекули засобу проникають у клітину паразита, після чого наступна кристалізація орнідазолу вже зсередини тіла лямблій буквально «розшматовує» її відповідно до закономірностей фізики зародження і росту кристала. Слід особливо виокремити той факт, що наведений феномен став доступним до-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

слідженню в результаті відтворення фазного процесу взаємодії клітин паразитів з орнідазолом безпосередньо в ході приготування мікропрепарату і наступного виявлення його методом поляризованої флуоресценції. Адекватність останньої завданню паразитологічних досліджень взагалі, а за участю протипаразитарних засобів — зокрема, впливає з анізотропних властивостей біомолекул клітин паразитів, зокрема нуклеїнових

кислот і ліпідів їх клітинних мембран як структур з рідкокристалічними властивостями [5], а також циклічних макромолекул протипаразитарних засобів, наприклад орнідазолу [6, 7]. Особливості флуоресценції кристалів орнідазолу залежно від ступеня розведення його у водному розчині, інші прояви реакції взаємодії лямблій з орнідазолом за різних розведень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Особливості взаємодії лямблій з орнідазолом при різних розведеннях за даними поляризованої флуоресценції

Об'єкт дослідження	Розведення орнідазолу					
	1:1	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁶
Кристали орнідазолу	Дрібні	Середні	Середні	Великі	Великі	Великі
Мазок із випорожнень хворого	Цитоліз, кристалізація, ++++	Кристалізація лямблій, ++++	Кристалізація лямблій, +++	Кристалізація лямблій, +++	Кристалізація лямблій, +++	Кристалізація лямблій, +++
Мазок із дуоденального вмісту	Цитоліз, кристалізація, ++++	Кристалізація лямблій, ++++	Кристалізація лямблій, +++	Кристалізація лямблій, +++	Кристалізація лямблій, +++	Кристалізація лямблій, +++

Наведені результати вказують на позитивні фармакодинамічні властивості орнідазолу, оскільки він індукує виражений протипаразитарний ефект навіть при розведенні 1:1000000, для якого характерним є високий рівень дисперсності мікрокристалів. Очевидно, цитоліз як форму деструкції лямблій слід визнати сприятливішою для організму, порівняно з мікрокристалізацією тіл паразитів, перш за все з огляду на необхідність вирішення завдання оптимізації шляхів біохімічної деградації та елімінації продуктів розпаду паразитів з організму.

Наведені результати засвідчують перспективність методичного прийому щодо попереднього визначення протипаразитарної активності лікувального засобу, що сприятиме підвищенню ефективності лікувальних технологій при паразитарних захворюваннях, зокрема викликаних жиардією тонкокишковою.

Висновки

1. Встановлено значний протипаразитарний ефект орнідазолу, який проявляється навіть при високих розведеннях препарату, зокрема при 1:10⁵ і 1:10⁶.

2. Метод цитололюмінесцентного аналізу на принципових засадах поляризованої флуоресценції виявився достатньо чутливим і репрезентативним для вивчення протипаразитарної активності орнідазолу.

Література

1. Малий В.П. Лямбліоз // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – № 3 (02). – С. 58-62.
2. Коровина Н.А. Диагностика и лечение лямблиоза у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2005. – Т. 50, № 1. – С. 38-41.
3. Крамарев С.А. Лямблиоз. Диагностика, клиника, лечение: метод. рекомендации – Киев, 2005. – 22 с.
4. Звіт про роботу Тернопільської санітарно-епідеміологічної станції за період 2004-2009 рр.
5. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978.–209 с.
6. Жевандров Н.Д. Поляризация света. – М.: Наука, 1969. – С. 125-140.
7. Varma R., Mayor S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. – Nature. – 1998. – V. 394. – P. 798-801.

EVALUATION OF THE ORNIDAZOLE ANTIPARASITOGENIC ACTIVITY

M.T. Kovalchuk, M.I. Shkilna

SUMMARY. The analysis of antiparasitogenic activity of ornidazole is presented. The substantiation of expediency of perfection microscopic parasitological analysis, in particular on the basis of luminescent methods of polarized fluorescence is resulted.

Key words: *Giardia intestinalis, ornidazole, antiparasitogenic activity, polarized fluorescence.*

Отримано 28.04.2011 р.