

## ПРОБЛЕМА РЕЗИСТЕНТНОСТИ *TRICHOMONAS VAGINALIS* К АНТИПРОТОЗОЙНЫМ ПРЕПАРАТАМ

А.Л. Позняк<sup>2</sup>, С.С. Козлов<sup>1</sup>, Р.В. Гудков<sup>1</sup>, Ю.Ф. Захаркив<sup>1</sup>, С.Н. Сидорчук<sup>1</sup>, О.Л. Молчанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург  
Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования,

<sup>2</sup> Санкт-Петербург

### The problem of resistant *Trichomonas vaginalis* to antiprotozoal drugs

A.L. Poznyak<sup>2</sup>, S.S. Kozlov<sup>1</sup>, R.V. Gudkov<sup>1</sup>, Yu.F. Zaharkiv<sup>1</sup>, S.N. Sidorchuk<sup>1</sup>, O.L. Molchanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Military Medical Academy by S.M. Kirov, Saint-Petersburg

<sup>2</sup> St-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Studies, Saint-Petersburg

**Резюме.** В обзоре представлены современные данные о энергетическом метаболизме *Trichomonas vaginalis* и путях активации метронидазола. Чувствительность микроорганизмов к 5-нитроимидазолам обеспечивается присутствием у них ферментных систем, генерирующих и транспортирующих электроны, которые впоследствии могут передать их на нитрогруппу препарата. У *T.vaginalis* таковыми являются пируват-ферредоксин-оксиредуктаза, тиоредоксин-редуктаза и флавин-редуктаза. Проанализированы аэробные, анаэробные и альтернативные механизмы развития резистентности у *T.vaginalis* к 5-нитроимидазолам. Развитие устойчивости *T. vaginalis* к препаратам группы метронидазола – многоступенчатый процесс, основанный на постепенном снижении (вплоть до утраты) активности гидрогеносомальных ферментов и/или нарушении метаболических флаavin-зависимых путей.

**Ключевые слова:** *Trichomonas vaginalis*, резистентность, гидрогеносомы, метронидазол.

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и антипротозойным препаратам – одна из наиболее серьезных проблем здравоохранения во всем мире, поскольку рост количества лекарственно-устойчивых штаммов служит основной причиной снижения эффективности этиотропной терапии инфекций и инвазий. Практически любой аспект этой проблемы является актуальным и интересным для различных специалистов, занимающихся диагностикой и лечением ИППП, так как назначение неэффективных схем лечения приводит к развитию резистентной трихомонадной инвазии.

До 1959 года лечение мочевого трихомониаза у женщин проводилось только местно с использованием неспецифических препаратов в виде инстилляций, аппликаций, тампонов, суппозиторий, вагинальных таблеток, порошков и желе, которые не проникали глубоко в эпителий

**Abstract.** This review presents recent data on the energy metabolism of *Trichomonas vaginalis* and ways the activation of metronidazole. The sensitivity of microorganisms to the 5-nitroimidazole by the presence of their enzyme systems, generating and transporting electrons, which can then transfer them to the nitro group of the drug. In *T.vaginalis* these are pyruvate ferredoxin-oxydoreductase, thioredoxin reductase and flavin reductase. The development of resistance *T.vaginalis* to metronidazole preparations of this multistep process, based on the gradual reduction (up to a loss) activity hydrogenosomal enzymes and / or violation of the flavin-dependent metabolic pathways.

**Key words:** *Trichomonas vaginalis*, resistance, hydrogenosomes, metronidazole.

влагалища и уретры, а также в бартолиевы железы. В результате такой терапии часто возникали рецидивы [3]. Указанные препараты оказались мало пригодными также для лечения урогенитального трихомониаза у мужчин [1, 2]. Все перечисленные недостатки в большей или меньшей степени присущи и современным препаратам (клотримазолу, ноноксинолу-9 и др.), которые используются для местной терапии трихомониаза [4, 5].

Во Франции в 1959 г. в Рон-Пуленской лаборатории была установлена высокая противотрихомонадная активность нитроимидазольного деривата, полученного из экстракта грибов рода *Streptomyces* азомицина – 1-(β-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазола (рис. 1). Такой препарат наиболее часто называют метронидазолом (син. «Клион», «Метровагин», «Метровит», «Метрогил», «Метрон», «Метросептол», «Розамет», «Розекс», «Трихо-ПИН», «Трихоброл», «Трихопол», «Трихосепт», «Флагил», «Эфлоран» и др.) [6].

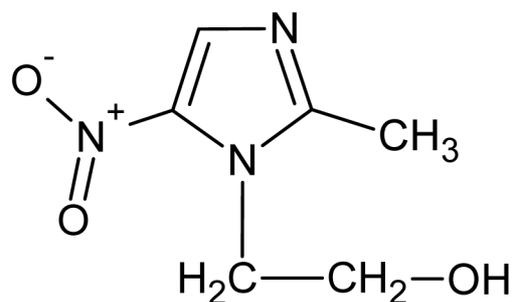


Рис. 1. Метронидазол, 1-(β-оксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол

По данным R.M. Ings, J.A. McFadzean and W.E. Ormerod (1974), паразитоцидное действие оказывает не сам метронидазол, а продукты его метаболизма в клетке паразита. Так, было показано, что метронидазол проникает через клеточную мембрану путем диффузии [29], превращается в цитотоксическое соединение в гидрогеносомах — органоидах, аналогичных митохондриям, у которых, однако, отсутствуют собственная ДНК, кристы и цитохромы [30]. Здесь нитрогруппа метронидазола в анаэробных условиях восстанавливается с помощью фермента пируват-ферредоксин-оксидоредуктазы (ПФОР) с образованием активного нитрорадикал-иона, который, взаимодействуя с ДНК возбудителя, вызывает ее разрушение [1, 31]. В результате в течение часа после действия препарата клетки *T. vaginalis* теряют подвижность и утрачивают способность к делению; спустя 8 часов трихомонады погибают [54].

Позднее появились другие препараты 5-нитроимидазольного ряда, такие как тинидазол [11], орнидазол [8], секнидазол [12], флюнидазол [10], ниморазол [9] и карнидазол [7], которые также были одобрены для клинического использования в различных странах, однако не все из них разрешены к применению в РФ.

Метронидазол является одним из редких примеров препаратов, который был разработан как антипротозойное средство, однако, как выяснилось, обладал и антибактериальной активностью, вследствие чего его использование получило широкое распространение. [13]. Так, помимо установленной антипротозойной активности в отношении *Entamoeba histolytica* в 1966 году [14] и *Giardia lamblia* (также известный как *Giardia duodenalis*) в 1970-х [15], у метронидазола была случайно обнаружена антибактериальная активность в отношении анаэробных бактерий. В 1962 году после лечения трихомонадного кольпита у пациентки одновременно произошло излечение от бактериального гингивита [16]. Однако данный препарат до 1970-х активно не применялся в терапии инфекций, вызванных такими грамотрицательными анаэроба-

ми, как *Bacteroides* spp. или грамположительными анаэробами клостридиями [13, 17]. Антибактериальная активность метронидазола и других препаратов 5-нитроимидазольного ряда объясняется тем, что они превращаются в промежуточные продукты метаболизма в цитоплазме анаэробных бактерий, которые способны вызывать повреждение структуры ДНК бактерий. Благодаря этому возникает быстрый бактерицидный эффект, который реализуется практически независимо от числа бактерий или фазы их роста. В основном препараты 5-нитроимидазольного ряда активны в отношении анаэробных бактерий (*Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., *Fusobacterium* spp.), а также грамотрицательных бактерий (*Gardnerella vaginalis*, *Helicobacter pylori* и др.). В строгих анаэробных условиях 5-нитроимидазольные препараты способны подавлять рост некоторых штаммов *E.coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. Таким образом, спектр активности данных препаратов достаточно широк, но все они наиболее часто применяются для этиотропной терапии протозойных инвазий и инфекций, вызванных анаэробными бактериями [18].

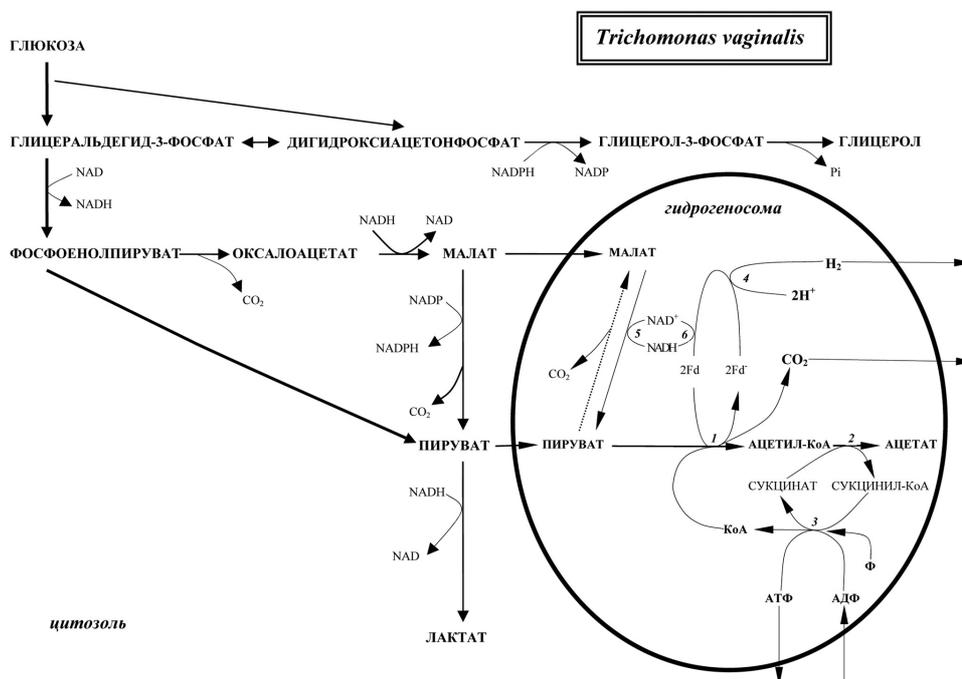
Антипротозойный эффект 5-нитроимидазолов зависит от их метаболизма в пределах клетки-мишени. Для полного понимания механизма действия метронидазола и других препаратов этой группы необходимо учитывать энергетический обмен простейших (рис. 2).

*T.vaginalis* получает энергию, которая выделяется в результате катаболизма углеводов, происходящего в цитозольном и гидрогеносомальных компартментах. Синтез АТФ происходит на уровне субстратного фосфорилирования. При этом цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование с участием цитохромов отсутствуют. Ферментативный процесс от гликогена или глюкозы до образования фосфоенолпирувата происходит в цитозоле. По существу, это согласовывается со схемой Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, за исключением того, что активность фосфофруктокиназы трихомонад зависит не от АТФ, а от неорганического пирофосфата. При этом указанный фермент не имеет типичной для АТФ-зависимой фосфофруктокиназы регулярной роли [19]. Фосфоенолпируват превращается в пируват (рис. 2) при участии непосредственно любой цитозольной пируват-киназы или путем обходного пути метаболизма через оксалоацетат и малат. В этот процесс вовлекаются такие ферменты, как фосфоенолпируват-карбоксикиназа, малатдегидрогеназа и цитозольная декарбоксилирующая малатдегидрогеназа [20]. Далее из цитозоля пируват и малат попадают в гидрогеносомы, которые способны метаболизировать малат в пируват в реакции декарбоксилирования, катализируемой НАД-зависимой малатдегидрогеназой [21]. Повторное

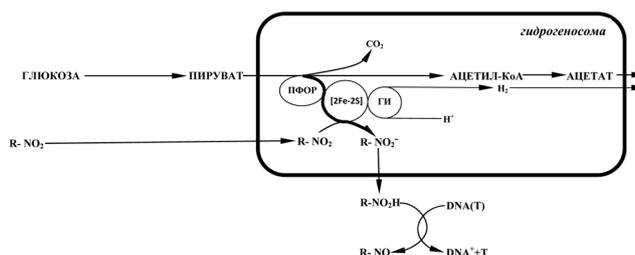
окисление NADH происходит при посредничестве ферредоксин-связанного фермента. A. Steinbuechel и M. Muller (1986) показали, что в изолированных органеллах реакция может протекать в обратном направлении, в связи с чем дополнительно включили малат в список конечных гидрогеносомальных продуктов [22]. Главная функция гидрогеносом — это окислительное декарбоксилирование пирувата путем, сопряженным с синтезом АТФ и связанным с ферредоксин-опосредованным электронным транспортом, который заканчивается образованием молекулярного водорода. Конечными продуктами метаболизма в гидрогеносомах являются ацетат,  $H_2$  и  $CO_2$ . Ключевой фермент в реакции превращения пирувата — это пируват-ферредоксин-оксидоредуктаза (ПФОР) — железосодержащий белок, превращающий пируват в ацетил-КоА [23, 24]. В дальнейшем КоА переносится на сукцинат при участии ацетат-сукцинат-КоА-трансферазы, в результате чего высвобождается ацетат. Сукцинил-КоА служит субстратом в реакции получения АТФ, которая катализируется сукцинат-тиокиназой (сукцинил-КоА синтетазой) [25, 26]. Высвобожденный в этом процессе КоА повторно перерабатывается в реакции, катализируемой ПФОР. Транспорт электронов, производимых ПФОР, зависит от двух других железосодержащих

белков: [2Fe-2S]-ферредоксина (переносчика электронов с низким окислительно-восстановительным потенциалом, сходного с митохондриальным ферредоксином) и [Fe]-гидрогеназы — терминального фермента, который присоединяет электроны к ионам водорода, в результате чего образуется молекулярный водород [27,28].

Общим свойством микроорганизмов, чувствительных к 5-нитроимидазолам, является присутствие у них систем, генерирующих и транспортирующих электроны, которые впоследствии могут передать их на нитрогруппу препарата. У *Trichomonas vaginalis* таковыми являются гидрогеносомы [30], в которых метронидазол действует как доминирующий акцептор электронов, эффективно конкурирующий за элементарные частицы, предназначенные для гидрогеназ (рис. 3). Как следствие, образование водорода останавливается и ферредоксин-опосредованный транспорт электронов направляется на метронидазол. Как и у других чувствительных микроорганизмов, восстановление нитрогруппы метронидазола происходит в одноэлектронных реакциях (рис. 4), в результате чего появляются токсичные промежуточные метаболиты. В целом, чтобы пройти процесс восстановления, 5-нитроимидазолам требуется не менее четырех электронов.



**Рис. 2.** Упрощенная схема энергетического метаболизма *Trichomonas vaginalis* (по J. Kulda, 1999). 1, пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза; 2, ацетат: сукцинил-КоА трансфераза; 3, сукцинил-КоА-синтетаза; 4, гидрогеназа; 5, L-малат: NADP оксидоредуктаза [декарбоксилирующая]; 6, NAD: ферредоксин-оксидоредуктаза; Fd, ферредоксин

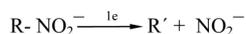


**Рис. 3.** Схема активации метронидазола в гидрогеносоме.  $R-NO_2$  – метронидазол;  $R-NO_2^-$  – нитроанион-радикал;  $R-NO_2H$  – протонированный нитроанион-радикал;  $R-NO$  – нитрозорадикал;  $DNA(T)$  – неповрежденная ДНК;  $DNA^+ + T^-$  – поврежденная ДНК; ПФОФ – пируват: ферредоксиноксиредуктаза;  $[2Fe-2S]$  – ферредоксин; ГИ – гидрогеназа



**Рис. 4**

Однако, у 5-нитроимидазолов восстановление дальше последовательности  $R-NH_2$  не происходит. Это обусловлено двумя причинами: во-первых, энергия, необходимая для восстановления гидроксилamina в амин в клетках слишком велика; во-вторых, в результате восстановления  $R-NO_2$  получается нитроанион-радикал ( $R-NO_2^-$ ), который подвергается быстрому расщеплению, что в конечном итоге приводит к образованию нитрит-иона ( $NO_2^-$ ) и радикала имидазола (рис. 5).



**Рис. 5**

Продолжительность существования повреждающего агента имеет решающее значение для действия лекарственных средств этой группы. В серии исследований J.H. Tocher and D.I. Edwards (1989), показали, что время жизни нитроанион-радикала отличаются в зависимости от восстановительного потенциала и характера среды. Период полураспада нитроанион-радикала вариabелен: при одинаковых условиях для нитрофуразона (фурацилин) он составляет около  $9 \times 10^{-2}$  секунд по сравнению с метронидазолом, у которого данный показатель составляет всего 9 секунд [31]. Исследователями R.J. Knox, D.I. Edwards and R.C. Knight (1981) было установлено, что тинидазол дает около 23% нитрит-анионов ( $NO_2^-$ ), метронидазол и орнидазол – около 30%. В настоящее время сведения о механизмах, в результате которых короткоживущие радикалы нитроимидазолов убивают чувствительных простейших, весьма немногочисленны и зачастую носят фрагментарный характер. Ни ингибирование продукции молекулярного водорода, ни нарушение транспорта электронов в восприимчивом организме недостаточно, чтобы объяснить, почему погибают клетки. Существуют некоторые экспериментальные данные, указывающие на то, что

одной из целей нитрит-иона является ДНК. Первые доказательства продемонстрировали R.M. Ings с соавторами (1974), которые в своих исследованиях показали, что метронидазол тормозит поглощение  $^{14}C$ -меченого тимидина в клетках *T. vaginalis* [29]. Впоследствии было показано, что нитроимидазолы не просто подавляют синтез ДНК, но и вызывают деструкцию существующих молекул ДНК. Последующие работы позволили установить, что степень повреждения ДНК зависит от состава азотистых оснований [32]. Было установлено, что нитроимидазолы повреждают ДНК, в которых процентное содержание комплементарных пар оснований аденин + тимин больше, чем гуанин + цитозин. Это говорит о том, что препарат вызывает разрыв цепи ДНК в конкретных местах. Наиболее вероятной мишенью является тимин. Это подтвердилось в опытах, в которых было установлено, что в результате взаимодействия нитроимидазолов с ДНК высвобождается только смесь тимина и тимидин-монофосфата, а другие азотистые основания и нуклеотиды отсутствуют. Конечным итогом этого высвобождения служит разрыв цепи ДНК [33]. Кроме того, предполагается повреждение других жизненно важных систем клетки, но прямых доказательств пока не получено. В результате в течение часа после действия препарата клетки *T. vaginalis* теряют подвижность и утрачивают способность к делению; спустя 8 часов трихомонады погибают.

Получив в свое распоряжение новый антипротозойный препарат, врачи стали активно исследовать его антипаразитарную активность и клиническую эффективность. В одном из первых клинических исследований, которое проводилось в Великобритании в 1960 году, R. Jennison, и L. Watt изучали эффективность проводимой этиотропной терапии на добровольцах. При этом они определяли чувствительность различных штаммов *T. vaginalis* к метронидазолу *in vitro*, выявляли концентрации метронидазола в моче после приема разовой и курсовой доз, а также пытались определить возможное токсическое воздействие препарата

на кровь, печень и почки. Все пациенты получали метронидазол по 600 мг в день на протяжении 7 суток. Из них у 19,4% (21 человек) после лечения наблюдался рецидив заболевания, однако только у 4 пациентов был обнаружен возбудитель. Тем не менее, все выделенные штаммы *T. vaginalis* оказались чувствительными к метронидазолу в концентрации от 0,125 мкг/мл до 1.0 мкг/мл [34]. Однако полученные данные не в полной мере отражали истинное положение дел, поскольку исследователи с целью подавления роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* в среду для культивирования *T. vaginalis* добавляли нистатин, который также может угнетать рост трихомонад в питательной среде. С учетом этого показатели концентрации метронидазола, к которым *T. vaginalis* проявляла чувствительность, могли быть другими.

С целью упрощения схемы лечения и снижения побочных эффектов A.R. Wisdom предложил назначать препарат в дозе 2 грамма в сутки однократно [36]. Обе схемы показали сопоставимую клиническую эффективность (72–98%). При этом при лечении обоих половых партнеров (вне зависимости от наличия у них клинических проявлений инвазии) значительно повышалась эффективность терапии [36, 37].

Через десять лет относительно удачного применения метронидазола появились новые препараты из группы 5-нитроимидазолов с более длительным периодом полувыведения. Так, L. Cohen, изучая трихомоноцидное действие ниморазола, назначал его по 250 мг два раза в день в течение 6 дней, а J. Wallin применял тинидазол в дозе 2 г однократно. В результате эффективность препаратов составила 98,4% и 96% соответственно [38, 39]. В 1973 году проведение двойного слепого клинического исследования показало 100% эффективность орнидазола [40].

В России также активно использовались 5-нитроимидазолы в лечении больных мочеполовым трихомониазом. Уже в 1966 г. в монографии Н.С. Ляховицкого, посвященной трихомониазу, метронидазол упоминается в конце списка протистостатических средств, который открывают препараты мышьяка.

Несмотря на многообещающие результаты проводимых курсов лечения среди больных мочеполовым трихомониазом были и такие, у которых после терапии высевались *T. vaginalis*. При этом полностью исключалась возможность реинвазии. В 60-е годы впервые было доказано, что причиной недостаточной эффективности терапии трихомониаза метронидазолом является устойчивость некоторых штаммов *T. vaginalis* к этому препарату. Впервые о метронидазол-резистентных штаммах сообщил S.C. Robinson [41]. В 1962 году S. Squires and J. A. Fadzean проводили оценку чувствительности 42 штаммов *T. vaginalis*, выделенных от

больных трихомониазом, которые получали стандартный курс этиотропной терапии метронидазолом (по 200 мг перорально 3 раза в день в течение 7 суток). Для оценки чувствительности применяли метод серийных разведений метронидазола в жидкой питательной среде, учет результатов проводили путем микроскопии содержимого опытных пробирок через 24 ч после инкубации в термостате. В качестве критерия оценки чувствительности авторами использовалась минимальная ингибирующая концентрация (МИС), под которой понимали минимальную концентрацию препарата, вызывающую 100% иммобилизацию трихомонад. Было установлено, что 26 штаммов были чувствительны к метронидазолу в концентрации 0,25 мкг/мл, 13 штаммов – к 0,5 мкг/мл и 6 – к концентрации 1 мкг/мл, на основании полученных данных был сделан вывод о чувствительности к метронидазолу всех исследованных штаммов [42].

Результаты более поздних работ, опубликованных в 60-х годах, позволяют сделать вывод о появлении в популяции возбудителя штаммов *T. vaginalis*, обладающих пониженной чувствительностью к метронидазолу. Так, Турановой Е.Н. с соавт. (1963) установлено, что только 74% штаммов были чувствительны к метронидазолу в концентрациях 0,5–1 мкг/мл. Kovacs Elek и Galgoszy Jozsef (1969) указывали, что если в 1964 г. все выделенные ими штаммы простейших были чувствительны к метронидазолу в концентрации 1,25 мкг/мл, то уже в 1968 году к этой концентрации препарата проявили чувствительность только 2 из 82 исследованных штаммов [43]. В работе З.Д. Старостиной (1971) изучалась чувствительность к метронидазолу штаммов трихомонад, выделенных от больных трихомониазом женщин. Было установлено, что только 65,3% штаммов трихомонад оказались чувствительными к метронидазолу в концентрации 0,25–1 мкг/мл. Остальные 34,7% обнаруживали чувствительность к значительно более высоким концентрациям препарата (1,5–3,5 мкг/мл), на основании чего был сделан вывод о росте удельного веса штаммов с пониженной чувствительностью к метронидазолу. Следует заметить, что автор сопоставлял степень чувствительности трихомонад к препарату и выраженность клинических проявлений у больных. Штаммы, чувствительные к концентрации 0,25–1 мкг/мл, выделялись более, чем у 2/3 больных с яркими клиническими проявлениями и только у половины больных с латентным течением трихомониаза [44]. Л.М. Корик (1971) в своей работе отмечал значительно более низкую чувствительность к метронидазолу у штаммов простейших, выделенных от больных, прошедших курс безуспешной этиотропной терапии [45].

**Признаки резистентности *T. vaginalis*  
к 5-нитроимидазолам**

Признаки аэробной устойчивости	Признаки анаэробной устойчивости
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проявляется только в присутствии кислорода</li> <li>2. Проявляется <i>in vivo</i> у штаммов <i>T. vaginalis</i>, выделенных от больных после безуспешного курса этиотропной терапии метронидазолом.</li> <li>3. Минимальная летальная концентрация метронидазола в аэробных условиях составляет около 100 мкг/мл.</li> <li>4. Штаммы, устойчивые к метронидазолу в аэробных условиях, могут проявлять чувствительность к этому препарату при отсутствии кислорода</li> <li>5. Механизм устойчивости реализуется за счет повторного окисления свободных нитро-анион-радикалов</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проявляется в анаэробных условиях</li> <li>2. Проявляется <i>in vitro</i>.</li> <li>3. Минимальная летальная концентрация для метронидазола в аэробных условиях составляет более 1000 мкг/мл.</li> <li>4. При культивировании в питательной среде, содержащей метронидазол в концентрации 100 мкг/мл, может наблюдаться размножение трихомонад</li> <li>5. Механизм устойчивости реализуется за счет блокировки метаболических путей, ответственных за активацию метронидазола</li> </ol>

О выделении метронидазол-устойчивых штаммов в Европе сообщали также A. Forsgen (1979), R. Heyworth (1980), S. Waitkins (1981) [46]. В 1978 году J.G. Meigassner удалось выделить штамм *Trichomonas vaginalis*, который был устойчивым не только к метронидазолу, но и к другим препаратам 5-нитроимидазольного ряда. В России о полирезистентных штаммах в своей работе сообщили Ю.Ф. Захаркив с соавт. (2008) [56]. J. Kulda et al. (1982) считали устойчивость штаммов *T. vaginalis* к метронидазолу основной причиной безуспешной этиотропной терапии мочепоолового трихомоноза [47]. J.G. Lossick, M. Muller et al. (1986) отмечали, что МИС не отражает реальную терапевтическую концентрацию препарата, создаваемую в сыворотке, однако позволяет подобрать дозу препарата, которая может оказаться эффективной [1]. В связи с этим стали пользоваться оценкой минимальной летальной концентрации (MLC), при которой происходит лизис всех штаммов *T. vaginalis*, а не их иммобилизация. В 90-е годы появились работы, свидетельствующие о более широком распространении штаммов *T. vaginalis*, резистентных к значительно более высоким концентрациям метронидазола. По данным Debbia et. al. (1996), МИС, устанавливаемая при исследовании штамма на чувствительность к препарату, варьирует от 0,5 до 32 мкг/мл. Однако, K.A. Borchardt et. al. (1995) указывают на более широкие пределы МИС: от 0,4 до 50 мкг/мл.

Резистентность к метронидазолу и другим представителям группы 5-нитроимидазолов была доказана и изучена на штаммах *Trichomonas vaginalis*, полученных от пациентов, у которых этиотропная терапия этим препаратом оказалась неэффективной. В результате проведенных исследований были выявлены два типа резистентности к препаратам 5-нитроимидазольного ряда: аэробная и анаэробная [49] (табл. 1).

Аэробная резистентность проявляется только тогда, когда в среде присутствует некоторое количество кислорода. Такая устойчивость штаммов возникает в результате захвата атомарного кислорода, т.е. тогда, когда повышение концентрации внутриклеточного кислорода может препятствовать активации препарата. В качестве возможного механизма ее развития можно рассматривать повторное окисление свободных нитро-анион-радикалов, в результате чего развивается конкурентное удаление электронов кислородом. При этом *T. vaginalis* проявляют чувствительность к метронидазолу в анаэробных условиях, так как у них сохраняются гидросомальные метаболические пути, ответственные за активацию данного препарата.

Таким образом, анаэробная устойчивость — это результат блокирования механизмов активации препарата, что приводит к полному исключению его фармакологического действия на *Trichomonas vaginalis*. Установлено, что такие штаммы сохраняют жизнеспособность при чрезвычайно высоких концентрациях метронидазола *in vitro* в анаэробных условиях. Характерной особенностью этих штаммов является отсутствие активности фермента пируват-ферредоксин-оксиредуктазы (ПФОР).

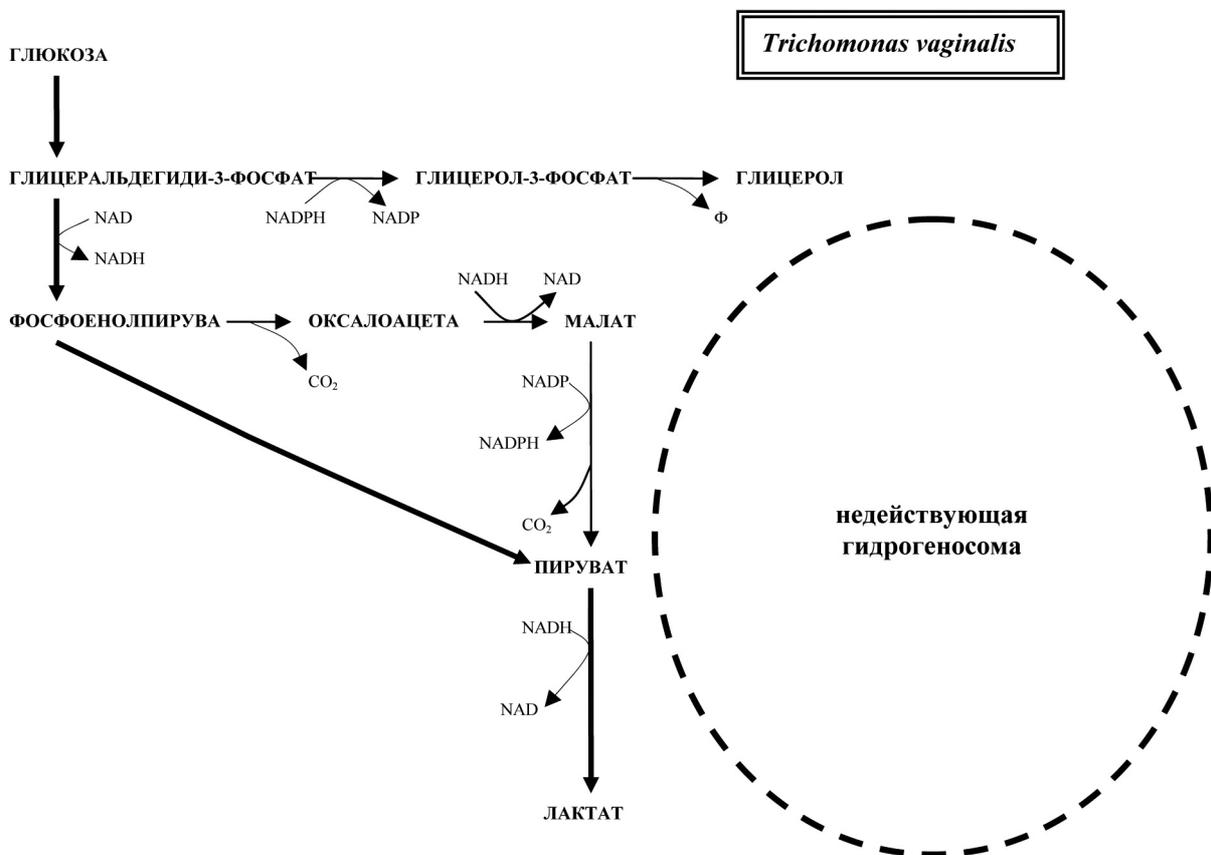
Развитие анаэробной устойчивости у *T. vaginalis* является более сложным, так как потеря активности ПФОР не приводит к приобретению полной резистентности. Активность исчезает в ранней фазе анаэробной резистентности, когда трихомонады чувствительны к повышенной концентрации препарата (MLC < 15 мкг/мл в анаэробных условиях). С помощью электронно-резонансной спектроскопии было выявлено, что ПФОР-дефицитные трихомонады сохраняют способность восстанавливать метронидазол. Таким образом, *T. vaginalis* обладает альтернативной системой генерации и переноса электронов для восстановления препарата. Это продемонстрировал J. Kulda et al. (1999); который установил, что в этом процессе принимает участие фермент гидрогеносомальная малатдегидрогеназа, катализирующая малат в пируват за счет NAD-зависимого окислительного декарбок-сирования, в результате чего удаляются электроны. Таким образом, впоследствии полученная

NADH повторно окисляется до NAD-ферредоксин-оксидоредуктазы и передает электроны на ферредоксин, который, в свою очередь, переносит их на препарат. Активность этих ферментов присутствует в ПФОР – дефицитных штаммах *T.vaginalis* на ранних стадиях анаэробной устойчивости, но отсутствует в штаммах с полностью развившейся анаэробной устойчивостью.

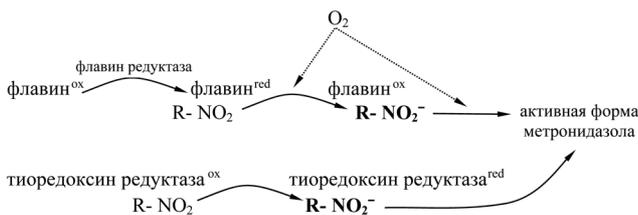
Важные изменения происходят также в цитозоле трихомонады. Устойчивые штаммы должны компенсировать потери гидрогеносомального метаболизма. Влагилищная трихомонада с полностью развитой анаэробной устойчивостью переходит на гомоферментативное молочнокислое брожение

(рис.6), превращая более 92% глюкозы в лактат. Это подтверждается высокой активностью пируваткиназы и повышенной активностью лактатдегидрогеназы [50].

В последние годы модель развития резистентности у штаммов *T. vaginalis* к 5-нитроимидазолам была дополнена. Так, D. Leitsch et. al. (2010) показали, что существуют дополнительные пути активации метронидазола за счет тиоредоксин-редуктазы и флавин-редуктазы (рис. 7). В аэробных условиях либо восстановлению метронидазола препятствует кислород, либо происходит повторное окисление флавинов или свободных нитроанион-радикалов [51].



**Рис. 6.** Схема энергетического метаболизма *Trichomonas vaginalis* после полностью развившейся резистентности к метронидазолу (по J. Kulda, 1999)



**Рис. 7.** Схема активации метронидазола в цитозоле.  $R-NO_2$  – метронидазол;  $R-NO_2^-$  нитро-анион-радикал;  $O_2$  – кислород

Таким образом, исследователями было показано, что развитие резистентности *T. vaginalis* к метронидазолу — это многоступенчатый процесс, основанный на постепенном снижении (вплоть до утраты) активности гидрогеносомальных ферментов и/или нарушением метаболических флавинозависимых путей. В дальнейшем нарушается высвобождение и транспорт электронов, а также нарушается механизм генерации радикалов, необходимых для осуществления протистоцидного действия метронидазола.

Среди других причин устойчивости трихомонад к антипротозойным препаратам некоторые авторы отмечают способность резистентных штаммов к продукции антитрипсина [55].

В 1989 году Центр по контролю за заболеваемостью США сообщил, что около 5% всех штаммов, выделенных от больных мочеполовым трихомониазом, обладают резистентностью к метронидазолу. На практике, больным трихомониазом, вызванным резистентными штаммами, назначают длительный курс этиотропной терапии повышенными дозами метронидазола. Однако, учитывая сохраняющийся ежегодный уровень заболеваемости мочеполовым трихомониазом, эффективность такой терапевтической тактики и целесообразность подобного подхода к этиотропной терапии этой инвазии вызывает сомнения.

Изученные механизмы устойчивости трихомонад дают основания полагать, что штаммы трихомонад должны обладать одинаковой чувствительностью ко всем препаратам 5-нитроимидазольного ряда, однако, как показывает практика, эффективность действия различных препаратов этой группы существенно отличается [7, 12, 39].

В последние десятилетия в литературе все чаще встречаются данные об увеличении в популяциях *T. vaginalis* удельного веса штаммов с атипичной морфологией клеток (округлых или овальных), слабоподвижных или неподвижных, тем не менее сохраняющих жизнеспособность не только в организме больного, но и *in vitro*. Такие клетки наиболее часто выделяются от больных, неоднократно и длительно лечившихся от мочеполового трихомониаза препаратами 5-нитроимидазольного ряда. Некоторые авторы называют их дегенеративными формами [52], формами самосохранения трихомонад [53] и даже псевдоцистами. В связи с частичным нарушением синтеза АТФ в них снижается уровень метаболизма, в частности, интенсивность синтеза тубулина. По-видимому, синтезируемый тубулин в основном расходуется на образование структур цитоскелета и обеспечение деления клетки, однако его явно недостаточно для формирования органоидов движения. Возможно, именно эти обстоятельства послужили основой для распространенности в популяции возбудителя штаммов,

содержащих амастиготные (безжгутиковые) формы трихомонад. Снижение циклоза (движения цитоплазмы) в таких клетках приводит к скоплению белков в субмембранном пространстве, и в свою очередь — к снижению их мембранной проницаемости. Поскольку способность препарата 5-нитроимидазольного ряда проникать через мембрану зависит не только от 5-нитроимидазольной группы, но и от радикала, обеспечивающего его специфичность и длительность действия, можно предположить, что различные препараты этой группы по-разному проникают через мембрану и по-разному метаболизируются в клетке простейшего. По-видимому, именно этим объясняется различная чувствительность трихомонад к разным препаратам 5-нитроимидазольного ряда, о которой свидетельствуют данные литературы [36]. Однако на данном этапе изучения проблемы резистентности трихомонад высказанное суждение является лишь гипотезой, для подтверждения которой требуются дальнейшие исследования. Необходимость таких исследований приобретает все большую актуальность и в связи с тем, что заражение резистентными штаммами способствует хронизации трихомонадной инвазии.

Данные анализа литературы позволяют сделать вывод о том, что на протяжении более чем 50-летнего опыта применения метронидазола и других препаратов этой группы наблюдается неуклонный рост количества устойчивых к нему штаммов, что приводит к существенному снижению эффективности этиотропной терапии. Недостаточно изученными остаются вопросы распространенности лекарственно-устойчивых штаммов *T. vaginalis* среди больных воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта, и, по-видимому, механизмы развития резистентности трихомонад к лекарственным препаратам.

При сохраняющейся актуальности терапии хронического мочеполового трихомониаза наиболее вероятными путями выхода из сложившейся ситуации является разработка протоколов ведения больных с предварительной оценкой устойчивости штаммов *T. vaginalis* к метронидазолу и другим препаратам 5-нитроимидазольного ряда. При наличии перекрестной резистентности к препаратам данной группы возможно их комбинирование с нитрофурановыми производными, в частности, с нифурателем.

#### Литература

1. Lossick J. G. In vitro drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis / J.G. Lossick, M. Muller, T. E. Gorrell // *J.Infect.Dis.* — 1986. — Vol. 153, № 5. — P. 948–955.
2. Lossick J. G. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management / J.G. Lossick, H.L. Kent // *Am.J.Obstet. Gynecol.* — 1991. — Vol.165, №5. — P. 1217–1222.

3. Pereyra A. J. Flunidazole — a new drug for systemic treatment of urogenital trichomoniasis / A.J. Pereyra, R.M. Nelson, D.J. Ludders // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1972. — Vol. 112. — P. 963–966.
4. Debbia E.A. In vitro activity of metronidazole alone and in combination with clotrimazole against clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. / E.A. Debbia, U. Campora, S. Massaro et al. // *J. Chemother.* — 1996. Vol. 8, № 2. — P. 96–101.
5. Du Bouchet L. Multicenter comparison of clotrimazole vaginal tablets, oral metronidazole, and vaginal suppositories containing sulfanilamide, aminacrine hydrochloride, and allantoin in the treatment of symptomatic trichomoniasis / L. Du Bouchet, M.R. Spence, M.F. Rein et al. // *Sex. Transm. Dis.* — 1997. — Vol. 24, №3. — P.156–160.
6. Cosar C. Activity of 1-(29-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (8823 RP) against experimental *Trichomonas vaginalis* infection / C. Cosar, L. Julou // *Ann. Inst. Pasteur.* — 1959. — An.96 — P. 238–241.
7. Chaudhuri P. A double-blind controlled clinical trial of carnidazole and tinidazole in the treatment of vaginal trichomoniasis / P. Chaudhuri, A.C. Drogendijk // *Eur.J.Obstet. Gynecol.* — 1980. — Vol. 10, № 5. — P. 325–328.
8. Fugere P. Single oral dose of ornidazole in women with vaginal trichomoniasis / P. Fugere, G. Verschelden, M. Caron // *Obstet. Gynecol.* — 1983. — Vol. 62, №4. — P. 502–505.
9. Hayward M.J. Two-day treatment of trichomoniasis in the female. Comparison of metronidazole and nimorazole / M.J. Hayward, R.B. Roy // *Br.J.Vener.Dis.* — 1976. — Vol. 52, № 1. — P. 63–64.
10. Pereyra A.J. Flunidazole—a new drug for systemic treatment of urogenital trichomoniasis / A.J. Pereyra, R.M. Nelson, D.J. Ludders // *Am.J.Obstet.Gynecol.* — 1972. — Vol. 112, № 7. — P. 963–966.
11. Sucharit P. In vivo and in vitro studies of tinidazole in *Trichomonas vaginalis* infection / P. Sucharit, A. Uthaischant, T. Chintana // *S.E.Asian J. Trop. Med. Public Health.* — 1979. — Vol. 10, №4. — P. 556–561.
12. Videau D. Secnidazole. A 5-nitroimidazole derivative with a long half-life / D. Videau, G. Niel, A. Siboulet // *Br.J.Vener. Dis.* — 1978. — Vol. 54, № 2. — P. 77–80.
13. Freeman C.D. Metronidazole. A therapeutic review and update / C. D. Freeman, N.E. Klutman, K.C. Lamp // *Drugs.* — 1997. — Vol. 54, № 5. — P. 679–708.
14. Ravdin J.I. Amebiasis. State-of-the-art clinical article / Ravdin J.I. // *Clin.Infect.Dis.* — 1995. — Vol. 20. — P. 1453–1464.
15. Zaat J.O. A systematic review on the treatment of giardiasis / J.O. Zaat, T.G. Mank, W.J. Assendelft // *Trop.Med. Int.Health.* — 1997. — Vol. 2, № 1. — P. 63–82.
16. Shinn D.L. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis / Shinn D.L. // *Lancet.* — 1962. — №1. — P. 1191.
17. Lau A.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives / A.H. Lau, N.P. Lam, S.C. Piscitelli // *Clin. Pharmacokinet.* — 1992. — Vol. 23, № 5. — P. 328–364.
18. Падейская Е.Н. Препараты группы 5-нитроимидазола для лечения анаэробных и протозойных инфекций / Е.Н. Падейская Е.Н. // *Инфекции и антимикробная терапия.* — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 4–7.
19. Mertens M. Presence of a fructose-2,6-bisphosphate-insensitive pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase in the anaerobic protozoa *Trichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis* and *Isotricha prostoma* / M. Mertens, E. Van Schaftingen, M. Muller // *Mol.Biochem.Parasitol.* — 1989. — Vol. 37, № 2. — P. 183–190.
20. Hrdý I. Identification, purification and separation of different isozymes of NADP-specific malic enzyme from *Trichomonas foetus* / I. Hrdý, E. Mertensa, E. Van Schaftingen // *Mol.Biochem.Parasitol.* — 1993. — Vol. 57, №2. — P. 253–260.
21. Drmota T. Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization / T. Drmota, P. Proost, M. Van Ranst // *J. Mol. Biochem. Parasitol.* — 1996. — Vol. 83, № 2. — P. 221–234.
22. Steinbüchel A. Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes / A. Steinbüchel, M. Müller // *Mol. Biochem. Parasitol.* — 1986. — Vol. 20, № 1. — P. 57–65.
23. Williams K. Purification and characterization of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the anaerobic protozoan *Trichomonas vaginalis* / K. Williams, P.N. Lowe, P.F. Leadlay // *J. Biochem.* — 1987. — Vol. 246, № 2. — P. 529–536.
24. Hrdý I. Primary structure and eubacterial relationships of the pyruvate: ferredoxin oxidoreductase of the amitochondrial eukaryote *Trichomonas vaginalis* / I. Hrdý, M. Muller // *J. Mol. Evol.* — 1995. — Vol. 41, № 3. — P. 388–396.
25. Jenkins T.M. Hydrogenosomal succinate thiokinase in *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* / T.M. Jenkins, T.E. Gorrell, M. Muller // *Biochem.Biophys.Res. Commun.* — 1991. — Vol. 179, № 2. — P. 892–896.
26. Lathi C.J. Molecular characterization of the  $\alpha$ -subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase / C.J. Lathi, P. Bradley, P.J. Johnson // *Mol. Biochem. Parasitol.* — 1994. — Vol. 66. — P. 309–318.
27. Marczak R. Hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protozoan *Trichomonas foetus* / R. Marczak, T.E. Gorrell, M. Muller // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258, № 20. — P. 12427–12433.
28. Johnson P.J. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis* / P.J. Johnson, C.E. Oliveira, T.H. Gorrell // *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* — 1990. — Vol. 87, №16. — P. 6097–6101.
29. Ings, R.M. The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other microorganisms / R.M. Ings, J.A. McFadzean, W.E. Ormerod // *Biochem.Pharmacol.* — 1974. — Vol. 23. — P. 1421–1429.
30. Muller M. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists / M. Muller // *Chin.Med.J.* — 1992. — Vol. 28, №1–3. — P. 33–40.
31. Tocher J.H. Electrochemical characteristics of nitroheterocyclic compounds of biological interest. IV. Lifetime of the metronidazole radical anion / J.H. Tocher, D.I. Edwards // *Free Radical Research Communications.* — 1989. — Vol. 6. — P. 39–45.
32. Rowley D.A. The relationship between misonidazole cytotoxicity and base composition of DNA / D.A. Rowley, R.C. Knight, I.M. Skolimowski // *Biochem.Pharmacol.* — 1980. — Vol. 29, № 15. — P. 2095–2099.
33. Knox R.J. Misonidazole-induced thymine release from DNA / R.J. Knox, R.C. Knight, D.I. Edwards // *Biochem. Pharmacol.* — 1981. — Vol. 30, №14. — P. 1925–1929.
34. Jennison R.F. Laboratory studies with the systemic trichomonacide, metronidazole / R.F. Jennison, P. Stenton, L. Watt // *J. Clin. Pathol.* — 1961. — Vol. 14. — P. 431–435.
35. Csonka G.W. Trichomonal vaginitis treated with one dose of Metronidazole / G.W. Csonka // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1971. — Vol. 47. — P. 456.
36. Wisdom A.R. Trichomoniasis study of the disease and its treatment / A.R. Wisdom, E.M.C. Dunlop // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1965. — Vol. 41. — P. 90.
37. Morton R.S. Metronidazole in the single-dose treatment of trichomoniasis in men and women / R.S. Morton // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1972. — Vol. 48. — P. 525.

38. Cohen L. Nitrimidazine in the treatment of *Trichomonas vaginalis* vaginitis / L. Cohen // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1971. — Vol. 47. — P. 177.
39. Wallin J. Tinidazole—a new preparation for *T. vaginalis* Infections / J. Wallin A. Forsgren // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1974. — Vol. 50. — P. 148.
40. Lean T.H. Treatment of vaginal trichomoniasis with a new anti-protozoal compound (cc-chloromethyl-2-methyl-5-nitro-1-imidazole-ethanol) / T.H. Lean, D. Vengadasalam // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1973. — Vol. 49. — P. 69.
41. Robinson S.C. Trichomonal vaginitis resistant to metronidazole / S.C. Robinson // *J. Canad. Med. Ass.* — 1962. — Vol. 86. — P. 665.
42. Squires S. Strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole / S. Squires J. A. McFadzean // *Brit. J. Vener. Dis.* — 1962. — Vol. 38. — P. 218.
43. Kovacs Elek dr. A *Trichomonas vaginalis* törzsek metronidazol erkezenysegéről / E. Kovacs, J. Galgoszy // *Orvosi Hetilap.* — 1968. — Vol. 110. — P. 66—68.
44. Старостина З.Д. Чувствительность трихомонады к флагилилу и ее значение в лечении трихомонадной инфекции у женщин / З.Д. Старостина // *Вестник дерматологии и венерологии.* — 1973. — № 10. — С. 84—85.
45. Корик Л.М. О штаммах *Trichomonas vaginalis* резистентных к метронидазолу / Л.М. Корик // *Вестник дерматологии и венерологии.* — 1971. — № 12. — С. 77—79.
46. Hayward M.J. Two-day treatment of trichomoniasis in the female. Comparison of metronidazole and nimorazole / M.J. Hayward, R.B. Roy // *Br. J. Vener. Dis.* — 1976. — Vol. 52, №1. — P. 63—64.
47. Kulda J. Experimental animals in studies of *T. vaginalis* infection / B.M. Honigberg // *Trichomonads parasitic in humans* — New York.: Springer-Verlag. — P. 112—153.
48. Lossick J.G. Therapy of urogenital trichomoniasis / B.M. Honigberg // *Trichomonads parasitic in humans* - New York.: Springer-Verlag. — P. 324—341.
49. Kulda J. Trichomonads: hydrogenosomes and drug resistance / J. Kulda // *International Journal for Parasitology.* — 1999. — Vol. 29, №2. — P. 199—212.
50. Cerkasovova A. Metabolic properties of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole under anaerobic conditions / A. Cerkasovova, J. Novak, J. Cerkasov // *Acta. Univ. Carolinae. Biol.* — 1988. — Vol. 30. — P. 505—512.
51. Leitsch D. The flavin inhibitor diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways / D. Leitsch, D. Kolarich, M. Duchêne // *Mol. Biochem. Parasitol.* — 2010. — Vol. 171, № 1. — P. 17—24.
52. Клименко Б.В. Трихомониаз мужчин, женщин и детей / Б.В. Клименко, Э.Р. Авазов, В.Б. Барановская, М.С. Степанова. — СПб.: Сюжет, 2001. — 192 с.
53. Самохин В.А. Морфология *Trichomonas vaginalis* и современные противотрихомонадные лекарственные средства / В.А. Самохин // *ИППП.* — 2002. — №5. — С. 15—18.
54. Nielsen M. H. In vitro effect of metronidazole on the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donne / M.H. Nielsen // *Acta Pathol. Microbiol.* — 1976. — Vol. 84. — P. 93—100.
55. Peterson K. M. Acquisition of alpha 1-Antitrypsin by a pathogenic strain of *Trichomonas vaginalis* / K. M. Peterson, J.F. Alderete // *Infect. Immun.* — 1983. — Vol. 40, № 2. — P. 640—646.
56. Захаркив Ю.Ф. Сравнительная оценка чувствительности *Trichomonas vaginalis* к препаратам 5-нитроимидазольного ряда и других групп *in vitro* и *in vivo* и контроль эффективности этиотропной терапии / Ю.Ф. Захаркив, С.С. Козлов, А.Ф. Никитин с соавт. // *Фарматека.* — 2008. - №9. — С. 48—52.

---

*Авторский коллектив:*

*Позняк Алексей Леонидович* — доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования; 8(921) 937-93-89; e-mail: sergei\_sidorchuk@mail.ru;

*Козлов Сергей Сергеевич* — профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии доктор медицинских наук; 8(812)542-60-03; e-mail: infectology@mail.ru;

*Гудков Роман Владимирович* — адъюнкт кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) Военно-медицинской академии; + 7906-2631913 e-mail: gudkoff@mail.ru;

*Захаркив Юрий Федорович* — доцент кафедры биологии Военно-медицинской академии кандидат медицинских наук; + 79213736777 e-mail: gudkoff@mail.ru;

*Сигорчук Сергей Николаевич* — кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 8(901) 300-23-62, e-mail: sergei\_sidorchuk@mail.ru;

*Молчанов Олег Леонидович* — старший научный сотрудник НИЛ репродуктологии кафедры акушерства и гинекологии Военно-медицинской академии доктор медицинских наук; + 7911-2163047; e-mail: moleg700@rambler.ru.