

Морфологические аспекты экспериментальной трихомонадной инфекции

Э.Н. Шумкова, К.С. Акышбаева, А.С. Маматова, Р. Касим

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан; Республика Казахстан, 050000, Алма-Ата, ул. Толе Би, 94

Контакты: Кульбаршин Сабыровна Акышбаева azurit10@mail.ru

Введение. Тенденция роста частоты асимптомных форм урогенитального трихомоноза, частоты осложнений со стороны репродуктивных органов, неизвестность многих аспектов нарушений сперматогенеза, влияющих на репродуктивную функцию, обуславливают необходимость поиска адекватной экспериментальной модели урогенитального трихомоноза. Отсутствие последней ограничивает наши возможности для проведения стандартизированных контролируемых исследований по изучению трансмиссии, патогенеза, иммунного ответа, терапии и разработке вакцин при трихомонадной инфекции.

Цель работы – изучение действия *Trichomonas vaginalis* на сперматогенный эпителий половозрелых особей морских свинок в условиях острого и хронического эксперимента.

Материалы и методы. Опыты проведены на модели «Репродуктивная система (морские свинки) + *Trichomonas vaginalis*», имитирующей естественный ход инфекции. Были сформированы 2 группы животных: 1-я ($n = 8$) – опытная, 2-я ($n = 2$) – контрольная. На фоне снижения иммунного статуса (гидрокортизон 125 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки в течение 2 дней) животным 1-й группы интрауретрально вводили взвесь, содержащую 1×10^6 трихомонад на 0,5 мл питательной среды, животным 2-й группы – 0,5 мл питательной среды. В условиях острого эксперимента 4 животных 1-й группы были умерщвлены на 9-й день (половина цикла сперматогенеза), другие 4 животных – на 30-й день (полный сперматогенный цикл). Животные контрольной группы были умерщвлены в эти же сроки. Материал для гистологического исследования был подготовлен по общепринятой схеме.

Результаты. На экспериментальной модели «Репродуктивная система (морские свинки) + *T. vaginalis*» показана стадийность и степень нарушений сперматогенеза в зависимости от длительности трихомонадной инфекции. В условиях острого эксперимента морфологические изменения соответствуют ранним изменениям воспалительного процесса. В условиях хронического эксперимента нарушение стратификации слоев сперматогенного эпителия, дистрофия клеток, появление двуядерных клеток свидетельствуют об аномальном цитокинезе с возможностью блокирования процессов формирования зрелых сперматозоидов.

Ключевые слова: *Trichomonas vaginalis*, экспериментальная модель урогенитального трихомоноза, нарушение сперматогенеза, аномальный цитокинез

DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-2-61-64

Experimental Trichomonas infection: Morphological aspects

E.N. Shumkova, K.S. Akyshbaeva, A.S. Mamatova, R. Kasim

S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Ministry of Health and Social Development of the Republic of Kazakhstan; 94 Tole Bi St., Alma-Ata, 050000, Republic of Kazakhstan

Background. Growth tendency the asymptomatic forms of an urogenital trichomoniasis, frequency of complications from reproductive organs, uncertainty of many aspects of the violations of a spermatogenesis influencing reproductive function all this proves need of search of the urogenital trichomoniasis adequate experimental model.

Lack of the corresponding experimental model is limited by our opportunities for carrying out the standardized, controlled researches on studying of transmission, pathogenesis, the immune answer, therapy and development of vaccines at a trichomonas infection.

Objective is studying action of *Trichomonas vaginalis* on a spermatogeny epithelium the mature of individuals of guinea pigs in the conditions of sharp and chronic experience.

Materials and methods. Experiments are made on the “Reproductive System (Guinea Pigs) + *Trichomonas vaginalis*” modeling the natural course of an infection. In experiment 2 groups of animals: 1st ($n = 8$) – experimental, 2nd ($n = 8$) – control were formed. Against the background of the reduction of the immune status (hydrocortisone 125 mg/kg intramuscularly 1 time in day during 2 days) the animals of the 1st group were injected intraurethral suspension containing 1×10^6 *Trichomonas* on 0.5 ml of culture medium, the animals of the 2nd group – 0.5 ml of medium. Under the condition of the acute experiment the animals were sacrificed on day 9 (the middle of the cycle of spermatogenesis) – I experienced group and on day 30 (full spermatogenic cycle) – II experimental group. The control animals were slaughtered in the same period. The material for histological study was prepared by the traditional way.

Results. In an experimental model of “Reproductive system (guinea pigs) + *T. vaginalis*”, staging and degree of disturbance of spermatogenesis, depending on the duration of trichomonas infection were shown. So, in acute experience morphological changes correspond

to changes in the early inflammatory process; in chronic – a violation of stratification layers of seminiferous epithelium, degeneration of the cells, the appearance of binucleate cells. All of this indicate for abnormal cytokinesis with the possibility of blocking the formation of mature sperm.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, experimental model of an urogenital trichomoniasis, violation of a spermatogenesis, abnormal cytokinesis

Введение

Урогенитальный трихомоноз является одной из основных причин хронических воспалительных заболеваний репродуктивных органов. Он характеризуется широким распространением бессимптомной и недиагностированной форм заболевания, при которых возрастает риск осложнений, ведущих к развитию вторичного бесплодия у мужчин и женщин, а также рака предстательной железы – наиболее часто диагностируемой формы рака и 2-й ведущей причины смерти от онкологических заболеваний среди мужчин [1–4]. Тенденция роста асимптомных форм урогенитального трихомоноза, осложнений со стороны репродуктивных органов обуславливают необходимость изучения патогенетических аспектов нарушений сперматогенеза.

Цель работы – изучение действия *Trichomonas vaginalis* на сперматогенный эпителий половозрелых особей морских свинок в условиях острого и хронического эксперимента.

Материалы и методы

Опыты были проведены на модели «Репродуктивная система (морские свинки) + *T. vaginalis*», имитирующей естественный ход инфекции. Для заражения морских свинок использовали штамм *T. vaginalis* № 8, идентифицированный по морфологическим, культуральным, биологическим характеристикам. Для эксперимента было взято 10 самцов беспородных половозрелых морских свинок с массой тела 450–500 г. Все животные до начала эксперимента находились на стандартном пищевом/питьевом рационе. За 2 нед до эксперимента животные прошли карантин. Для исключения индигенной трихомонадной инфекции предварительно было проведено микроскопическое и культуральное исследование микрофлоры уретры. При отрицательных результатах животных включали в исследование.

Животные были разделены на 2 группы: 1-я ($n = 8$) – опытная, 2-я ($n = 2$) – контрольная. Для воспроизведения трихомонадной инфекции на фоне снижения иммунного статуса морским свинкам предварительно внутримышечно вводили гидрокортизон в дозе 125 мг/кг массы тела 1 раз в сут в течение 2 дней. На следующие сутки животным 1-й группы внутриуретрально вводили взвесь, содержащую 1×10^6 трихомонад на 0,5 мл питательной среды, животным 2-й группы – 0,5 мл питательной среды. Путем передозировки эфира 4 животных 1-й группы были умерщвлены на 9-й день (половина цикла сперматогенеза), другие 4 животных –

на 30-й день (полный сперматогенный цикл). Животные 2-й группы были умерщвлены в эти же сроки.

Материал для гистологического исследования был подготовлен по общепринятой схеме. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки сперматогенеза готовили отпечатки семенников с последующей их фиксацией и окраской водным раствором эозина. Полученные препараты изучали с использованием микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) с окуляром $\times 10$ и объективами $\times 4$, $\times 10$. Применяли методы вариационной статистики с определением среднеарифметической величины, средней ошибки среднеарифметической величины, t -критерия Фишера. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$. Исследование выполнено с соблюдением этических норм работы с животными и с разрешения Этического комитета Казахского национального медицинского университета (регистрация № 191).

Результаты морфологического исследования в условиях острого эксперимента

При вскрытии животных 1-й группы на 9-й день после введения инфекта внешних изменений кожи и слизистых оболочек не обнаружено. У этих животных по сравнению с животными 2-й группы в условиях острого эксперимента количество аномальных сперматозоидов (отсутствие хвостиков, укороченный и деформированный хвостик, укороченная головка и др.) возросло в 2,7 раза (32 и 12 % соответственно; $p \leq 0,05$), в условиях хронического эксперимента – в 1,3 раза (16 и 21 % соответственно) (табл. 1). В условиях острого эксперимента количество подвижных сперматозоидов у животных 1-й группы уменьшилось в 1,4 раза ($65,0 \pm 9,1$ % против $93,0 \pm 3,5$ % в контроле; $p \leq 0,05$), в условиях хронического эксперимента – количество находилось в пределах контрольных значений ($85,0 \pm 12,3$ % и $87,0 \pm 6,6$ % соответственно). На 30-й день от момента введения возбудителя у морских свинок 1-й группы достоверно значимо увеличилось в 2,7 раза количество сперматозоидов с признаками нарушения строения, достоверно снизилось в 1,4 раза количество живых сперматозоидов. У морских свинок 2-й группы количество живых сперматозоидов составляло 87–93 %.

Результаты микроскопического исследования: половой член выстлан многослойным плоским ороговевающим эпителием с очаговой пролиферацией базальных клеток. Строма отечная, соединительная ткань разволокнена. Стенка уретры утолщена за счет отека. Эпи-

телей слизистой оболочки местами десквамирован, в просвете слизи с единичными эпителиальными клетками (рис. 1).

В левом и правом яичках наблюдалась картина выраженного отека и полнокровия сосудов с нарушением конфигурации канальцев. Сперматогенный эпителий сохранен, местами отмечается его десквамация от базальной мембраны. Придатки яичка: гистологическое строение сохранено, наблюдаются выраженный отек и полнокровие сосудов, в просвете которых присутствовали клетки сперматогенного эпителия вместе с клетками десквамированного эпителия. В цитологическом препарате видна трихомонада с четко выраженным ядром (рис. 2). Семявыносящий проток: выраженный отек с отслойкой слизистой оболочки от подлежащей ткани, наблюдается десквамация эпителия в просвет вместе с единичными сперматозоидами и слизью.

Результаты морфологического исследования в условиях хронического эксперимента

Ткань уретры утолщена за счет выраженного отека. Эпителий уретры сохранен на всем протяжении. Сосуды спавшиеся, стенка отечна, разволокнена, эндотелий сохранен. При микроскопическом исследовании тканей яичка морфологические изменения были однотонны: общее строение сохранено, наблюдается дисконплексаия семенных канальцев за счет выраженного отека. Канальцы разной формы и размеров с преобладанием эллипсоидных. В отдельных уголках канальцы плотно прилегают друг к другу, между ними отчетливо выявляется в виде узкой полоски эозинофильная жидкость. Клетки находятся на базальной мембране, между ними расположены мелкие треугольноподобные клетки Сертоли (опорные клетки сперматогенного пласта). В других канальцах большая часть клеток десквамирована и на базальной мембране остаются единичные клетки с размытой цитоплазмой и клетки с контурами ядер. Полученные нами результаты согласуются с экспериментальными данными W.A.R. Kharofa

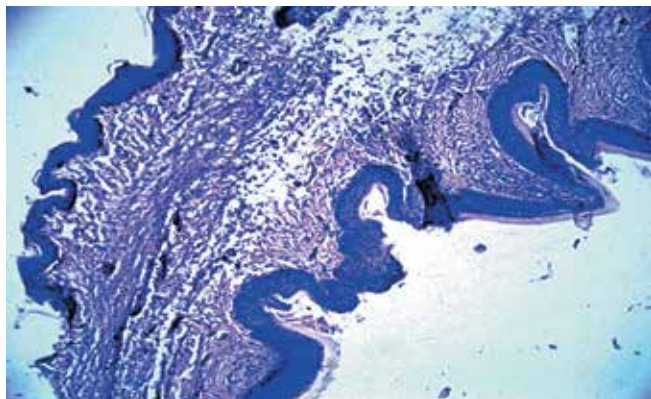


Рис. 1. Стенка уретры: отек и десквамация эпителия. Окраска гематоксилином, $\times 200$

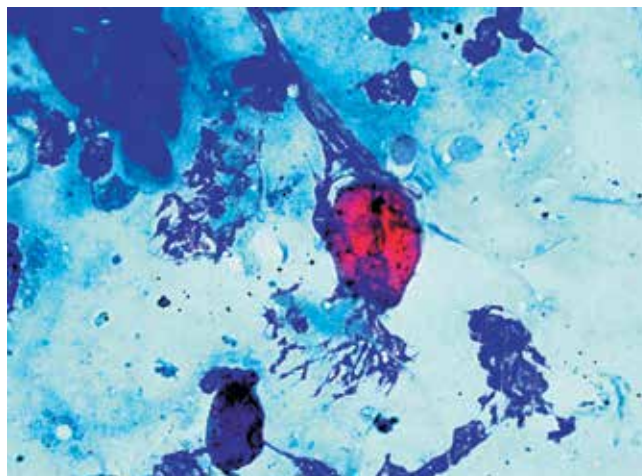


Рис. 2. Цитологический препарат. Окрашивание по Романовскому–Гимзе, $\times 900$

и соавт., которые показали, что семенники являются одним из важных органов, вовлекаемых при паразитемии [5]. Наряду со сперматогониями в отдельных канальцах наблюдали крупные двуядерные клетки с базофильным ядром и эозинофильной цитоплазмой (рис. 3). Наличие двуядерных клеток свидетельствует об аномальном цитокинезе с возможностью блокирования процесса формирования зрелых сперматозоидов. Сосуды яичка спавшиеся, их просвет щелевидный. Стенка утолщена за счет отека. Эндотелий сочный, набухший с нечетким ядром и мутной цитоплазмой.

Результаты цитологического исследования

Группа	Количество подвижных морфологически неизмененных сперматозоидов	Количество патологических форм сперматозоидов
<i>Острый эксперимент</i>		
1-я	65,0 \pm 9,1	32,0 \pm 2,7*
2-я	93,0 \pm 3,5*	12,0 \pm 0,4
<i>Хронический эксперимент</i>		
1-я	85,0 \pm 12,3	21,0 \pm 5,4
2-я	87,0 \pm 6,6	16,0 \pm 3,9

* $p \leq 0,05$.

Ткань придатка сохраняет свое гистологическое строение. Канальцы округлой и большей частью овальной формы, выстланы утолщенным кубическим эпителием с крупным базофильным ядром и эозинофильной цитоплазмой. Между отдельными канальцами выявляется отечная жидкость, просвет канальцев придатка заполнен сперматогенной жидкостью с большим количеством сперматозоидов. Семявыносящий проток сохраняет гистологическое строение, выстлан однородным

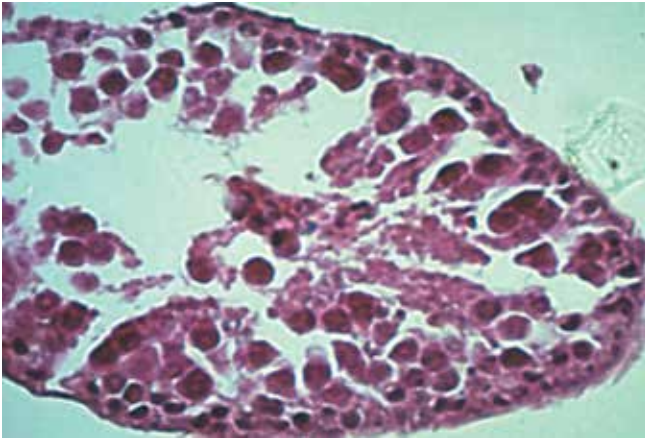


Рис. 3. Двухъядерные сперматогонии. Окраска гематоксилином, $\times 400$

кубическим эпителием. В отдельных местах клетки эпителия лишены ядра и представлены аморфными массами. Стенка протока утолщена за счет отека.

Заключение

Разработанный нами способ внутриуретрального заражения *T. vaginalis* максимально моделирует естественный ход инфекции и позволяет изучить ее действие на сперматогенный эпителий половозрелых особей морских свинок. Сроки эксперимента коррелировали с циклом сперматогенеза морских свинок: 9 дней после заражения – острый эксперимент, 30 дней – хронический эксперимент. Цитологическое исследование мазков-отпечатков семенников показало, что в ранние

сроки инфекции наблюдается увеличение количества аномальных сперматозоидов в 2,7 раза ($p \leq 0,05$), при хронизации – в 1,3 раза. Действие трихомонад на подвижность выражено в ранние сроки: количество подвижных сперматозоидов уменьшалось в 1,4 раза ($65,0 \pm 9,1$ % против $93,0 \pm 3,5$ %; $p \leq 0,05$); при хронизации – в пределах контрольных значений ($85,0 \pm 12,3$ % и $87,0 \pm 6,6$ % соответственно). При гистологическом исследовании в условиях острого эксперимента были выявлены изменения в виде выраженного отека, полнокровия сосудов и десквамации эпителия придатка, яичка, что соответствует начальной фазе воспаления. При хронической модели трихомонадой инфекции в тканях яичка наблюдались нарушения стратификации слоев сперматогенного эпителия с дистрофией клеток, появлением двухъядерных клеток, свидетельствующие об аномальном цитокинезе с возможностью блокирования процесса формирования зрелых сперматозоидов.

Экспериментальная модель «Репродуктивная система (морские свинки) + *T. vaginalis*» и дизайн эксперимента позволяют использовать ее в дальнейшем для исследований по изучению степени нарушений сперматогенеза в зависимости от генотипа трихомонад, других инфекций, передаваемых половым путем, для доклинических испытаний фармакологических препаратов, создания новых препаратов, предназначенных для лечения и профилактики осложнений репродуктивной системы при инфекциях, передаваемых половым путем.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Акышбаева К.С., Джусупгалиева М.Х., Калоиди И.А. Клинико-лабораторные особенности урогенитального трихомоноза у мужчин. В кн.: Тезисы докладов научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики кожных, венерических, вирусных заболеваний, ВИЧ/СПИД, гепатитов В, С, TORCH-инфекции и проблем косметологии», посвященной 80-летию дерматовенерологической службы Харьковщины и 350-летию г. Харькова. 2004. С. 136. [Akyshbaeva K.S., Dzhusupgalieva M.Kh., Kaloidi I.A. Clinical and laboratory peculiarities of urogenital trichomoniasis in men. In book: Abstracts of research-to-practice Conference "Actual issues of diagnostics, treatment and prevention of skin diseases, sexually transmitted diseases, viral diseases, HIV/AIDS, hepatitis B, C, TORCH-infection and cosmetology problems", dedicated to the 80th anniversary of Dermatovenereology Service of Kharkov region and the 350th anniversary of the city of Kharkov. 2004. P. 136. (In Russ.)].
2. Akyshbayeva K.S., Kaloidi I.A., Dzhusupgalieva M.X. Specter of activity of protistocidal preparations on *Trichomonas vaginalis*. 14th congress of the EADV. England, London, 2005.
3. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10–29.
4. Mitteregger D., Aberle S.W., Makristathis A. et al. High detection rate of *Trichomonas vaginalis* in benign hyperplastic prostatic tissue. *Med Microbiol Immunol* 2012;201(1):113–6.
5. Kharofa W.A.R., Rahman R.H.A., AL-Sammak M.A.A. Histological changes of mice testis infected with *Trichomonas vaginalis in vivo*. *Tikrit J Pure Sci* 2010;15(2):11–6.