

Научно-исследовательский институт  
акушерства и гинекологии им.Д.О.Отта  
000 "Микробиомед "

"Утверждаю"  
Зам. Директора 000 "Микробиомед"  
Новикова Л.Н.

" 29 " июня 2001 г.

ОТЧЕТ

Исследование противомикоплазменной активности  
медицинского препарата криомелт - МН

Санкт - Петербург  
2001 г

ВВЕДЕНИЕ

Микоплазмы - самые мелкие самореплицирующиеся микроорганизмы, занимающие промежуточное место по уровню структурной организации между вирусами и бактериями. Главной отличительной особенностью этого класса микроорганизмов (Mollicutes,) является отсутствие настоящей клеточной стенки, а наличие вместо нее трехслойной клеточной мембраны, состоящей на две трети своей массы из протеинов. Биологические особенности микоплазм ( прежде всего высокая изменчивость антигенных структур ) позволяют им успешно противостоять действию иммунной системы организма. Эти микроорганизмы живут и размножаются на мембранах и внутри клеток хозяина, что препятствует их фагоцитозу. Они обладают цитотоксическим действием, подавляющим пролиферацию лимфоцитов и активацию Т - киллеров. Благодаря этим особенностям микоплазмы могут сформировать состояние длительно персистирующей инфекции и оказывать иммунодепрессивное действие на организм [1,2].

Наиболее часто микоплазмы обнаруживаются при урогенитальных инфекциях. При этом среди различных видов микоплазм одно из ведущих мест занимает *Mycoplasma hominis*. Разработанные и используемые в практике схемы лечения микоплазменных инфекций, как правило, основываются на достаточно длительных (от 7 до 14 дней) курсах антибиотикотерапии, что нередко приводит к различного рода осложнениям [ 3, 4, 5 ]. В связи с этим актуальна проблема поиска и разработки новых препаратов, обладающих противомикоплазменной активностью, но не имеющих столь отрицательного воздействия на весь организм.

Цель данного исследования - изучение действия препарата криомелт-МН на микоплазмы.

I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 1. МИКОПЛАЗМЫ

В работе использовался штамм *Mycoplasma hominis* НЗ.

Музейный штамм был восстановлен, накоплен и поддерживался в количестве, необходимом для постановки опытов.

Для роста микроорганизмов использовались жидкие и плотные питательные среды с соответствующими для *Mycoplasma hominis* селективными и дифференциальными свойствами. Культуральный бульон помимо необходимых ростовых элементов ( пептоны, дрожжевой экстракт, лошадиная сыворотка) содержал специфический субстрат, являющийся метаболическим маркером для *Mycoplasma hominis* ( аргинин) и индикатор ( феноловый красный ) для подтверждения роста микоплазм по изменению цвета среды вследствие повышения рН.

Основой для плотной питательной среды служил триптозный агар, в который добавляли аналогичные бульону нестойкие составляющие - дрожжевой экстракт и лошадиную сыворотку.

Составы сред полностью соответствовали общепринятым в мировой практике стандартам, используемым при культуральных исследованиях микоплазм [ 6 ].

Инфекционные титры микоплазм определялись путем последовательного разведения микроорганизма в определенном объеме жидкой питательной среды с последующим (через 48 часов) высевом на плотную питательную среду из каждого разведения с помощью калиброванной бактериологической петли ( диаметр 4 мм - объем 0,01мл.). Учет и интерпретация результатов проводилась через 48 часов инкубирования микроорганизма в бульоне на основании изменения цвета среды и данных микроскопии колоний, выросших на плотной среде через 48 часов после посева - время, необходимое для формирования микоплазменных колоний на агаре.

Колонии подсчитывались непосредственно на агаре под микроскопом (объектив x10) и выражались числом колониобразующих единиц (КОЕ) в соответствии с принятыми в микробиологической практике критериями количественного учета микоплазм ( диагностические наборы фирмы " bioMerieux" и др.) и на основании многолетнего собственного опыта работы с микоплазмами. Согласно этим критериям этиологически значимым титром микоплазм считается 10 КОЕ, начиная с которого микоплазмы проявляют признаки роста не только в питательном бульоне, но и способны формировать микроскопически видимые колонии на агаре. ( табл. 1 ).

Таблица 1

Критерии количественной оценки микоплазм

Число колоний в поле зрения

Титр пробы

объектив x10	объектив x3.5	КОЕ
менее 1	менее 1	10 <sup>3</sup>
1-5	1-10	10 <sup>4</sup>
5-15	10-100	10 <sup>5</sup>
15-30	100-1000	10 <sup>6</sup>
30-50	сливной рост	10 <sup>7</sup>

## 2. ДОКСИЦИКЛИН

Доксициклин является известным препаратом тетрациклинового ряда, наиболее широко и успешно используемым в практике лечения микоплазменных инфекций.

Использовалась порошкообразная форма Doxycyclini hydrochloridum (фирма ICN Biomedicals Inc. ), из которого был приготовлен рабочий раствор, содержащий 0,001 мг/мл препарата.

Таблица 2

Определение противомикоплазменной активности  
доксциклина

Концентрация доксициклина мг/мл Титр микоплазм (КОЕ)

	$10^6$	$10^7$
0,0000025	$10^6$	$10^7$
0,00005	$10^5$	$10^6$
0,0001	$10^4$	$10^6$
0,00015	$10^3$	$10^5$
0,0002	-	$10^4$
0,00025	-	$10^4$
0,0003	-	$10^4$
0,00035	-	$10^3$
0,0004	-	$10^3$
0,00045	-	$10^3$
0,0005	-	-
Контроль	$10^6$	$10^7$

Для изучения чувствительности микоплазм к доксициклину использовался ряд разведений от 0,0000025 мг/мл до 0,0005 мг/мл.

Действие доксициклина испытывалось на 2-х теоретически выбранных в качестве наиболее оптимальных дозах микоплазм –  $10^6$  и  $10^7$  КОЕ. Эти дозы микроорганизма были выбраны для опытов как дающие известное достаточно большое число колоний на агаре, но при этом четко различающиеся между собой. Благодаря этому они обеспечивают наиболее оптимальные пределы для изучения количественных изменений микоплазм с учетом колониеобразующих единиц - от  $10^7$  до  $10^4$ ,

Учет и интерпретация результатов по действию доксициклина на микоплазмы производилась согласно вышеописанным критериям количественной оценки микоплазм.

На основании полученных данных для дальнейших исследований были выбраны 2 дозы доксициклина - 0,00005 мг/мл (Д-1) и 0,0001 мг/мл (Д2), не подавляющие до конца рост микоплазм и оставляющие достаточные пределы для их количественных изменений.

### 3. КОМПЛЕКСНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА КРИОМЕЛТ-МН с ДОКСИЦИКЛИНОМ

В пробирки с 1,8 мл жидкой питательной среды вносили по 0,2 мл соответствующего разведения микоплазм -  $10^6$  (МД-1) или  $10^7$  (МД-2) КОЕ, по 0,2 мл МН и по 0,05 мл доксициклина в концентрации 0,00005 мг/мл (Д-1) или 0,0001 мг/мл (Д-2).

Исследуемыми группами были следующие:

- Препарат МН + микоплазмы в дозах МД-1 и МД-2
- Доксициклин + микоплазмы в дозах МД-1 и МД-2

- Препарат МН + Доксициклин + микоплазмы в дозах МД-1 и МД-2

Контрольными группами служили;

- Микоплазмы в дозах МД-1 и МД-2

Были проведены опыты с различными вариантами введения препарата МН:

- однократное - одновременно с микоплазмами
- двухкратное -одновременно с микоплазмами и через 1 час после начала инкубирования микоплазменной культуры
- трехкратное - одновременно с микоплазмами, через 1 час и через 24 часа от начала инкубирования.

Проводилось наблюдение за жизнеспособностью микоплазм под воздействием изучаемых препаратов в динамике - через 48, 72 и 96 часов.

Оценку эффективности действия криомелта-МН и доксициклина на микоплазмы производили в соответствии с вышеизложенными критериями количественного учета этого микроорганизма.т.е. появлению признаков роста в жидкой питательной среде и путем подсчета колоний на плотной питательной среде, выросших в течение 48 часов из высевов, произведенных из питательного накопительного бульона, в котором микоплазменная культура предварительно инкубировалась тоже 48 часов ( оптимальное время, при котором микоплазмы достигают пик размножения).

## II.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 2

Влияние препаратов МН на репродукцию микоплазм при различных вариантах введения в культур

- трехкратное - одновременно с микоплазмами, через 1 час и через 24 часа от начала инкубирования.

Проводилось наблюдение за жизнеспособностью микоплазм под воздействием изучаемых препаратов в динамике - через 48, 72 и 96 часов.

Оценку эффективности действия криомелта-МН и доксициклина на микоплазмы производили в соответствии с вышеизложенными критериями количественного учета этого микроорганизма.т.е. появлению признаков роста в жидкой питательной среде и путем подсчета колоний на плотной питательной среде, выросших в течение 48 часов из высевов, произведенных из питательного накопительного бульона, в котором микоплазменная культура предварительно инкубировалась тоже 48 часов ( оптимальное время, при котором микоплазмы достигают пик размножения).

## П.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 2

Влияние препаратов МН на репродукцию микоплазм при различных вариантах введения в культуру

Препарат + культура микоплазм      Кол-во проб (бульон)

Кол-во чашек с агаром      Кол-во микоплазм  
(среднее число колоний / титр (КОЕ))

			1-кратно	2-кратно	3-кратно
МД-1+МН	30	30	8/10 <sup>5</sup>	3 / 10 <sup>4</sup>	4 / 10 <sup>4</sup>
МД-1+Д-1	30	30	10 / 10 <sup>5</sup>	9 / 10 <sup>5</sup>	8 / 10 <sup>5</sup>
МД-1+Д-1+МН	30	30	4/10 <sup>4</sup>	--	--
МД-1+Д-2	30	30	3 / 10 <sup>4</sup>	4 / 10 <sup>4</sup>	3 / 10 <sup>4</sup>
МД-1+Д-2+МН	30	30	0/10 <sup>3</sup>	--	--
МД-1(контроль)	30	30	22 / 10 <sup>6</sup>	22 / 10 <sup>6</sup>	22 / 10 <sup>6</sup>
МД-2+ МН	30	30	20 / 10 <sup>6</sup>	8 / 10 <sup>5</sup>	11 / 10 <sup>5</sup>
МД-2+Д-1	30	30	21 / 10 <sup>6</sup>	10 / 10 <sup>5</sup>	9 / 10 <sup>5</sup>
МД-2+Д-1+МН	30	30	10 / 10 <sup>5</sup>	0/10 <sup>3</sup>	0/10 <sup>3</sup>
МД-2+Д-2	30	30	12 / 10 <sup>5</sup>	2 / 10 <sup>4</sup>	3 / 10 <sup>4</sup>
МД-2+Д-2+МН	30	30	4 / 10 <sup>4</sup>	--	--
МД-2(контроль)	30	30	36 / 10 <sup>7</sup>	36 / 10 <sup>7</sup>	36 / 10 <sup>7</sup>

Полученные результаты показывают, что однократное введение препарата МН приводило к снижению интенсивности роста микоплазм на 1 порядок.

Комплексное введение МН и доксициклина в микоплазменные культуры приводило к более интенсивному снижению числа жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с действием одного доксициклина. Различия между этими группами были тоже в пределах одного порядка.

Двухкратное введение МН приводило к еще более значительному снижению скорости роста микоплазм в жидкой питательной среде, оставляя их на уровне минимальных титров, способных давать лишь небольшое количество колоний на агаре или возможно подавляя их полностью в случаях отсутствия колоний из некоторых проб.

Трехкратное использование препарата МН не приводило к заметным количественным изменениям по сравнению с его двухкратным введением.

Таблица 3

Влияние МН на жизнеспособность микоплазм в динамике

Препарат + культура микоплазм

Кол-во проб (бульон)

Кол-во чашек (агар)

Титр микоплазм ( среднее  
число колоний / титр (КОЕ))

			48 час.	72 час.	96 час.
МД-1+МН	20	60	10/10 <sup>5</sup>	6 / 10 <sup>5</sup>	0 / 10 <sup>3</sup>
МД-1+Д-1	20	60	9 / 10 <sup>5</sup>	8 / 10 <sup>5</sup>	3 / 10 <sup>4</sup>
МД-1+Д-1+МН	20	60	4/10 <sup>4</sup>	3 / 10 <sup>4</sup>	0 / 10 <sup>3</sup>

МД-1+Д-2	20	60	$4 / 10^4$	$3 / 10^4$	$1 / 10^4$
МД-1+Д-2+МН	20	60	$0 / 10^3$	$0 / 10^3$	$0 / 10^3$
МД-1(контроль)	20	60	$25 / 10^6$	$17 / 10^6$	$14 / 10^6$
МД-2+ МН	20	60	$24 / 10^6$	$11 / 10^5$	$0/10^3$
МД-2+Д-1	20	60	$26 / 10^6$	$10 / 10^5$	$3 / 10^4$
МД-2+Д-1+МН	20	60	$12 / 10^5$	$3 / 10^4$	$0/10^3$
МД-2+Д-2	20	60	$14 / 10^5$	$11 / 10^5$	$0/10^3$
МД-2+Д-2+МН	20	60	$3 / 10^4$	$0/10^3$	$0/10^3$
МД-2(контроль)	20	60	$42 / 10^7$	$28 / 10^6$	$12 / 10^5$

При наблюдении за жизнеспособностью микоплазм под воздействием препарата МН в динамике в процессе инкубирования культуры в течение от 48 до 96 часов отмечалось значительное увеличение скорости гибели микроорганизма после 48 часов вплоть до возможной полной их гибели к 96 часам (нет колоний на агаре ) в присутствии МН по сравнению со скоростью их естественного вымирания в контрольных культурах.

В процессе работы было замечено некоторое уменьшение размеров микоплазменных колоний на агаре при высевах из культур, которые подвергались воздействию МН.

### III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что препарат криомелт-МН оказывает влияние на микоплазмы, снижая интенсивность их роста и жизнеспособность *in vitro*.

Препарат МН усиливает противомикоплазменное действие доксициклина.

Двухкратное введение препарата МН предпочтительнее по сравнению с его однократным использованием.

Дополнительным свидетельством повреждающего действия МН непосредственно на микоплазменные клетки является уменьшение размеров колоний на агаре под влиянием препарата.

Противомикоплазменное действие препарата криомелт-МН на микоплазмы вероятнее всего связан с отсутствием клеточной стенки у этого микроорганизма, что делает его достаточно неустойчивым к повреждающим факторам такого характера.

Полученные данные могут иметь значение в клинической медицине для разработки новых, более рациональных методов лечения микоплазменных инфекций, а также для лабораторной практики с применением клеточных культур в решении проблемы их микоплазменной контаминации.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Краткий определитель бактерий Берги. М., 1980, 425-430.
2. Razin S., Yogeve D., Naon Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Review..1998, 1094-1156.
3. Новикова Л.Н., Тараскина А.Е. Урогенитальные микоплазмы и репродуктивное здоровье женщин.  
Материалы XXXVI научно-практической конференции дерматовенерологов. Санкт-Петербург, 2001, 43-44.
4. Прилепская В.И., Абуд Н.Ю. Урогенитальный микоплазмоз. МРЖ, 1998, 5, 295-300.

5. Серов В.Н., Шахтмейстер И.Я., Чеботарев В.В. и др. Значение генитальных инфекций в формировании распространенных гинекологических заболеваний и их современное лечение ( информационное письмо ). М., 1997,

6. Manual of Clinical Microbiology. 1991, 478-482.

Руководитель: Кирпичникова Г.И.

Исполнитель: Новикова Л.Н.