

Ж.Г. Морева¹, М.М. Васильев², В.П. Сащенко³, А.Ю. Миронов⁴

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *TRICHOMONAS VAGINALIS* У БОЛЬНЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НА ФОНЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА

¹ГБОУ ВПО Ивановская государственная медицинская академия; 153012, Иваново, Россия; ²ФГУ ГНЦ дерматовенерологии и косметологии Росмедтехнологий, Москва; 107076, Москва, Россия; ³НУЗ Отделенческая больница на станции Иваново ОАО «РЖД»; 153043, Иваново, Россия; ⁴ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; 119881, Москва, Россия

Морева Жанна Германовна, E-mail: morevash@mail.ru

♦ Показано, что у больных с онкологическими заболеваниями на фоне воспалительных заболеваний органов малого таза во время проводимой терапии *Trichomonas vaginalis* может находиться как на слизистых оболочках гениталий, так и в периферической крови. Представлены результаты микроскопического анализа морфологии форм *T. vaginalis*, выделенных из периферической крови, с использованием комплекса лабораторных методов у больных с онкологическими заболеваниями гениталий и молочных желез. Метод ферментативного гемолиза крови позволяет отличать трихомонады от клеток крови. Непрямая реакция иммунофлюоресценции может использоваться как экспресс-метод диагностики необычно протекающей трихомонадной инфекции у пациенток с онкологическими заболеваниями гениталий и молочных желез.

Ключевые слова: трихомоноз, атипичные формы трихомонад, онкологические заболевания гениталий и молочных желез, наличие трихомонад в крови

J.G. Moreva, M.M. Vasilyev, V.P. Saschenko, A.Yu. Mironov

THE MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF TRICHOMONAS VAGINALIS IN PATIENTS WITH ONCOLOGIC DISEASES AGAINST THE BACKGROUND OF INFLAMMATORY DISEASES OF ORGANS OF PELVIS MINOR

The Ivanovo state medical academy, Ivanovo, The state research center of dermatovenerology and cosmetology of Rosmedtehnologii, Moscow, The department hospital at the railroad station Ivanovo of "RGD", Ivanovo, The I.M. Sechenov first Moscow medical university, Moscow

♦ The article demonstrates that in patients with oncologic diseases against the background of inflammatory diseases of organs of pelvis minor during applied therapy *Trichomonas vaginalis* can be located both on the mucous membranes of genitalia and in peripheral blood. The results of microscopic analysis are presented concerning the morphologic characteristics of *T. vaginalis* separated from peripheral blood of patients with oncologic diseases of genitalia and mammary glands. The comprehensive kit of laboratory procedures was applied. The procedure of fermentative hemolysis of blood makes it possible to distinguish between trichomonad and blood cells. The indirect reaction of immunofluorescence can be applied as an express-test of diagnostic of unusual course of trichomonad infection in female patients with oncologic diseases of genitalia and mammary glands.

Key words: trichomonosis, atypical form of trichomonad, oncologic disease, genitalia, mammary gland, presence of trichomonad in blood

По прошествии более 170 лет с момента выделения А. Донне трихомонад из влагалища женщин важность проблемы трихомоноза остро встает в связи с возможным протеканием патологического процесса в генерализованной форме с длительной персистенцией возбудителя в периферической крови.

Согласно данным зарубежной литературы, отмечается высокий процент выделения *Trichomonas vaginalis* у женщин со злокачественными поражениями гениталий [23]. Исследователи S. Sayed el-Ahl [26], E. El-Gayar и M. Rashwan [15] отмечают особую роль *T. vaginalis* среди других возбудителей, передаваемых половым путем, в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии с последующим образованием злокачественных опухолей шейки матки. Б.В. Клименко и соавт. [4] описывают нахождение трихомонад в пораженной ткани при раке Педжета, имеющем различную локализацию. Многие исследователи [4, 8, 11] отмечают возможность проникновения *T. vaginalis* в ткани, что свидетельствует о системном поражении организма простейшими. Способность трихомонад проникать в ткань с возможным распространением возбудителя через кровь и лимфу была описана в фундаментальных трудах исследователей 60—70-х годов прошлого века [6, 9]. Ю.Х. Терас [9], экспериментально наблюдавший тканевый паразитизм трихомонад, пишет, что "большинство клиницистов трактуют трихомонадное воспаление как местный поверхностный воспалительный процесс слизистой оболочки..., совершенно игнорируют возможность

восхождения инфекции и проникновения ее в глубже лежащие ткани" [9]. М.М. Васильев [1] при моделировании трихомонадной инфекции у животных показал наличие генерализованной формы трихомоноза на фоне иммуносупрессии. Большую инвазивность трихомонад с обнаружением их в периферической крови наблюдали многие исследователи [2, 5, 6, 10, 19, 28].

Инвазивные свойства трихомонад возникают после специфической адгезии за счет лектиноподобных белков и фибронектина к муциновому слою слизистых оболочек, а далее за счет пяти различных протеаз, обладающих, в частности, и муциназной активностью, трихомонады проходят через слизистый слой [21]. Дальнейшая персистенция возбудителя происходит за счет литического фактора LF-фосфолипазы, содержащей активные фракции с молекулярной массой 144 и 168 кДа [22, 27], а также за счет протеазы CP-65, оказывающей цитотоксическое действие на клетки макроорганизма [12]. Продвижение трихомонад через ткани возможно за счет выделения возбудителем факторов распространения: ферментов гиалуронидазы, нейраминидазы, клеточного разъединяющего фактора и протеаз, воздействующих на спектрин мембраны клеток [13, 18, 24]. Способствуя ухудшению реологических свойств крови, *T. vaginalis* секретирует гемолитический фактор — белок, ответственный за повреждение эритроцитов без предварительного контакта клеток; повреждающее действие также возможно в результате обязательного контакта двух клеток — трихомонады и эритроцита [14, 17, 25].

Показатель	Больные раком молочных желез (n = 22)	Больные с онкологическими заболеваниями органов малого таза (n = 33)	Группа больных в целом (n = 55)	Женщины без патологии (n = 40)	Отклонения показателя в группе больных (n = 55) от границ нормы
Гемоглобин, г/л	118,80	119,30	119,16	131,1	Снижение у 47,27%
Эритроциты, · 10 ¹² /л	3,89	3,84	3,86	4,20	Снижение у 52,72%; у 30,91% наблюдаются анизоцитоз, пойкилоцитоз и анизохромия
Лейкоциты, · 10 ⁹ /л	6,41	6,93	6,72	5,94	Повышение у 14,5%
СОЭ, мм/ч	19,0	28,0	24,16	7,0	Повышение у 72,72%
Нейтрофилы, %:					
палочкоядерные	1,5	2,0	1,8	2,6	В пределах нормы
сегментоядерные	63,45	67,82	66,07	59,7	Повышение у 30,01%
Эозинофилы, %	1,9	2,06	2,0	2,20	В пределах нормы
Лимфоциты, %	27,72	21,30	23,87	29,3	Снижение у 38,18%
Моноциты, %	5,36	6,85	6,25	6,20	В пределах нормы

Инвазивным свойствам возбудителя способствуют выраженный полиморфизм трихомонад, наличие сразу нескольких приспособительных структур для движения, обуславливающих поступательное и вращательное движение, а также движение вокруг продольной оси тела, что позволяет возбудителю двигаться в жидких средах, таких как кровь и лимфа.

Проникновению *T. vaginalis* в периферическое русло способствует выраженное иммуносупрессивное действие патогена на клетки организма [16], а также снижение иммунологической реактивности макроорганизма на фоне онкологического заболевания. Выявлена связь между раком цервикального канала с текущей или перенесенной трихомонадной инфекцией [20, 26].

В связи со сказанным целью работы явилось исследование крови у больных с онкологическими заболеваниями гениталий и молочных желез на инфицированность *T. vaginalis* с последующим изучением морфологических и культуральных особенностей выявленных форм возбудителя.

Морфологические свойства *T. vaginalis* изучали у 55 женщин в возрасте от 22 до 78 лет (средний возраст 54,7 года), являющихся пациентками Ивановского областного онкологического диспансера. Обследованную группу составили 33 женщины с онкологическими заболеваниями органов малого таза и 22 больных раком молочной железы. У 36,4% больных с онкологическими заболеваниями гениталий диагностирован рак яичников, у 27,3% — рак тела матки, у 12,1% — рак цервикального канала, у 9,1% — миома матки в сочетании с эндометриозом, полипом цервикального канала, поликистозом яичников, спаечным процессом органов малого таза (СПОМТ), у 9,1% — рак шейки матки, у 3% — рак вульвы, у 3% — злокачественная опухоль забрюшинного пространства с метастазами в левый яичник и печень. У 21,21% больных основной диагноз рака сочетался с диагнозом канцероматоза брюшной полости. У 90,91% больных с онкологическими заболеваниями гениталий, которые обследовались в период химиотерапии или после нее, рак сочетался с основными сопутствующими заболеваниями — хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ). При анализе структуры ВЗОМТ установлено, что у 26,70% больных рак сочетался с миомой матки и цервицитом, сальпингитом, кистой яичников; у 23,33% — с эндометритом на фоне синильного кольпита, фиброзного полипа цервикального канала; у 23,33% — с железистым полипом эндометрия на фоне кистозных образований шейки матки и яичников, у 10% — с эрозией шейки матки и аденокистозом эндометрия; у 10% — с цистоцеле вместе с кистой эндометрия; у 3,32% — с фиброзно-железистым полипом шейки матки и кистой яичников, у 3,32% — с кистой стромы эпителия влагалища и

шейки матки. У 45,46% женщин, больных раком молочных желез, диагностирован рак правой молочной железы, у 40,91% — рак левой молочной железы, у 9,09% больных — рак обеих молочных желез, у 4,54% — мастит обеих молочных желез. У 50% больных наблюдались метастазы рака в лимфатические узлы, в некоторых случаях в легкие. Больные раком молочных желез в 90,91% случаев обследованы после комбинированной химиотерапии и лучевой терапии. В группе больных раком молочных желез ВЗОМТ встречались у 77,27% женщин. У 35,3% больных рак молочных желез сочетался с хроническим аднекситом, кольпитом, кистой яичников, СПОМТ, у 29,41% — с цервицитом, у 17,65% — с цистоцеле и синильным кольпитом, у 11,76% — с миомой матки и кольпитом на фоне СПОМТ, у 5,88% — с эндометритом. У всех больных был диагностирован мочеполовой трихомоноз. Контролем служили 40 здоровых женщин в возрасте от 18 до 30 лет (средний возраст 20,1 года). Комплекс лабораторных методов включал микроскопический анализ мазков, взятых из заднего свода влагалища и цервикального канала, нативных и окрашенных по Граму, Май-Грюнвальду—Романовскому, исследование цервикальных выделений культуральным способом, методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и непрямой реакции иммунофлюоресценции — нРИФ (набор для флюоресценции ТрихоСкан, "ЛабДиагностика", Москва). Культуральную диагностику трихомоноза осуществляли при использовании обогащенной среды Тетраса. Основные гематологические показатели определяли по общепринятым методам. Анализ периферической крови, взятой из локтевой вены, с целью обнаружения трихомонад проводили путем микроскопического исследования нативных и окрашенных препаратов. Разработана методика выделения трихомонад из крови, включающая гемолиз форменных элементов крови с использованием протеолитических ферментов пепсина и трипсина с последующим микроскопическим и культуральным исследованием гемолизированного осадка [3]. Идентификацию форм трихомонад, выделенных из крови, осуществляли путем: культивирования ферментативно разрушенной и цельной крови с последующими серийными пересевами (сделано до 10 пассажей), исследования выделенных культур методом нРИФ, ПЦР с использованием тест-системы AmpliSens (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), тест-системы для диагностики трихомоноза (Институт молекулярной генетики, Москва). ПЦР ставили в лаборатории молекулярной диагностики Института молекулярной генетики. Микрофотографирование проводили с использованием цифровой фотокамеры Webbers Myscope 300M, электронного микроскопа просвечивающего типа ЭМВ 100Л (× 10 000), применяя метод отпечатков. Всего было проведено более 700 различных исследований.

У обследованных больных с трихомонозом и онкологическим заболеванием наблюдается изменение гематологических показателей (см. таблицу), что возникает как основное проявление патологического воздействия опухоли, а также может обнаруживаться в процессе терапии [7]. При снижении показателей красной крови, лимфоцитов и повышении показателей лейкоцитарного звена в периферической крови была обнаружена *T. vaginalis*, что в данном случае отражает возможность проникновения трихомонад в кровь, являясь частным случаем паразитемии (но это не трихомонадный сепсис!). Сепсис развивается в случае не только присутствия возбудителя в крови, но и его активного размножения и патологического воздействия на организм, что приводит к развитию синдрома системной воспалительной реакции, диагностируемой по определенным критериям.

При обычном просмотре мазков крови *T. vaginalis* трудноразличима среди форменных элементов крови, особенно при изменении типичной формы, мимикрии в условиях иммунной реакции организма. На рис. 1 (на вклейке) показана типичная форма *T. vaginalis* среди пойкилоцитов, выделенная в мазке крови у больной с инвазивным протоковым раком левой молочной железы и сопутствующим СПОМТ, поликистозом яичников после гамматерапии. Микроскопически выделенные трихомонады были подтверждены всем комплексом лабораторных методов. Трихомонады, попадая в несвойственное для себя место обитания — периферическую кровь, изменяют свое типичное морфологическое строение, переходя в атипичные формы. Рис. 2 (на вклейке) отражает картину крови у больной раком яичников в сочетании с миомой матки и полипом эндометрия. На фоне клеточных элементов крови заметна цистоподобная форма трихомонады. Представленная округлая форма возбудителя, равномерно окрашенная, хорошо отличима от нейтрофила и моноцита, у которых присутствуют характерные для данных клеток ядра. Наличие паразитемии было подтверждено всем комплексом лабораторных методов. Рис. 3 (на вклейке) отражает огромные адаптивные возможности трихомонад и длительную выживаемость в условиях макроорганизма. Представлен мазок крови больной с трихомонозом и метастазирующим раком тела матки (основной диагноз) после внутриматочной гамматерапии. На фоне пойкилоцитов заметна округлая форма трихомонады, ядро четко не просматривается, трихомонада не окрасилась и выглядит блестящей. Выраженная зона дифракции света вокруг формы свидетельствует об изменении физико-химических свойств оболочки, что и определяет адаптацию этих форм возбудителя. Появление подобных округлых форм трихомонад, плохо окрашивающихся, наблюдается и в мазках, взятых со слизистых оболочек гениталий, на фоне типичных форм возбудителя. На рис. 4 (на вклейке) представлен мазок из влагалища больной с миомой матки, железисто-кистозной гиперплазией эндометрия и аднекситом. Наличие трихомонад в крови было подтверждено путем исследования крови ферментативным методом, культивированием, нРИФ.

Чтобы отличить возбудителя от клеток крови была разработана методика, согласно которой трихомонады выделялись из крови. Экспериментально разработанная методика, включающая гемолиз форменных элементов крови с использованием 1% раствора ферментов пепсина или трипсина [3], позволяла выявлять трихомонады из ферментативно гемолизированной крови, в которой возбудитель сохраняется благодаря наличию на поверхности клеток большого количества антитрипсина, обеспечивающего защиту от протеолитических ферментов [4]. На рис. 5 (на вклейке) показана округлая форма трихомонады на фоне начала ферментативного гемолиза клеток крови, выделенная от больной раком тела матки с поликистозом яичников. У представленной на рис. 5 (см. вклейку) клетки трихомонады хорошо выражена оболочка, защищающая и от ферментативного разрушения.

Трихомонады, выделенные из крови, были идентифицированы комплексом лабораторных методов у 74,55% онкологических больных. Идентификацию проводили путем культивирования ферментативно разрушенной и цельной крови с последующим выделением чистой культуры трихомонад. Только в 29,27% случаев при первичном посеве гемолизированной крови в выделенных чистых культурах трихомонад наблюдались типичные формы *T. vaginalis* (рис. 6 на вклейке). В остальных случаях в посевах выделялись лишь единичные типичные клетки возбудителя (рис. 7 на вклейке) на фоне клеток трихомонад с измененными морфологическими свойствами (рис. 8 на вклейке). Для идентификации таких культур проводили серийные пересевы на обогащенную среду Тераса; в некоторых случаях требовалось проведение до 10 пассажей на питательные среды, что приводило к реверсии атипичных форм и размножению типичных клеток *T. vaginalis*. Культуральный анализ крови с выделением форм трихомонад отражен на рис. 9 (на вклейке). После исследования крови микроскопическим, ферментативным методом был сделан посев крови больных с онкологическими заболеваниями на обогащенную среду Тераса. Через 6 сут культивирования выявляли единичные типичные подвижные трихомонады на фоне округлых малоподвижных клеток. После четырех серийных пересевов таких культур наблюдали увеличение количества грушевидных форм трихомонад. Выделенные культуры трихомонад были подтверждены методами нРИФ и ПЦР.

В большинстве случаев (74,55%) трихомонады были выявлены из цельной и ферментативно разрушенной крови при помощи нРИФ. Исследование методом нРИФ показало, что типичные формы *T. vaginalis* проявляли очень яркое, особенно по краям и в центре клетки, светло-зеленое свечение (рис. 10 на вклейке), измененные формы трихомонад также проявляли люминесцентное свечение, но менее яркое и равномерное. Такой вид флюоресценции объясняется наличием совершенно иных биохимических и антигенных свойств у атипичных форм *T. vaginalis*. У 29,09% обследованных методом нРИФ в крови обнаруживали в среднем 7,2 клетки трихомонады в поле зрения, а у остальных онкологических больных с трихомонозом в крови при просмотре более 10 полей зрения обнаруживали единичные клетки возбудителя (в среднем 1,6 клетки в поле зрения). Методом нРИФ обследовали все выделенные из крови культуры трихомонад, которые при этом были подтверждены. В контрольной группе при исследовании методом нРИФ специфического свечения, говорящего о наличии трихомонад, в мазках крови не наблюдали.

При исследовании крови методом ПЦР трихомонады не выявлялись. ПЦР давала положительные результаты только после предварительного культивирования крови, выделения чистой культуры *T. vaginalis* и постановки реакции с культуральным осадком. Пробы крови, подтвержденные на наличие трихомонад методом нРИФ, были также верифицированы в виде чистых культур типичных форм трихомонад методом ПЦР в 75,61% случаев.

При обследовании 85 женщин в возрасте от 20 до 62 лет (средний возраст 39,9 года) с ВЗОМТ без онкологического заболевания с целью определения *T. vaginalis* на слизистых оболочках гениталий и в крови, было установлено, что трихомонады в крови обнаруживались, но лишь в единичных случаях и в виде единичных клеток, как правило у больных, с отягощенным гинекологическим анамнезом и наличием нескольких эпизодов трихомоноза.

Проведенные исследования морфологических особенностей *T. vaginalis*, выделенных из периферической крови гинекологических больных с онкологическими заболеваниями, определенно указывают на возможность протекания трихомонадной инфекции в форме паразитемии. Проникновение трихомонад в кровь у онкологических