

Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, т. 3. – С. 8–13.
Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. – 2009. – Vol. 17, N 3. – P. 8–13.

УДК 579.22+579.61

О. С. Воронкова, О. А. Сірокваша, Т. М. Полішко, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

ВПЛИВ УВЕДЕННЯ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА НА СКЛАД МІКРОФЛОРИ ПІХВИ МИШЕЙ ПРИ ІМУНОСУПРЕСІЇ

Досліджено вплив інтравагінального введення суспензії клітин добової культури індигенного штаму *Staphylococcus aureus* на склад мікрофлори піхви мишей при створенні у тварин експериментальної імуносупресії. Показано, що за умов експериментальної імуносупресії введення клітин стафілокока викликає розвиток генералізованої інфекції. У складі мікрофлори піхви мишей відбуваються зміни, пов'язані зі зниженням кількості лактобацил і зростанням кількості стафілококів і представників ентеробактерій.

О. С. Воронкова, Е. А. Сірокваша, Т. Н. Полишко, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОКА НА СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ ВАГИНЫ МЫШЕЙ ПРИ ИММУНОСУПРЕССИИ

Исследовано влияние интравагинального введения суспензии клеток суточной культуры индигенного штамма *Staphylococcus aureus* на состав микрофлоры вагины мышей при создании у животных экспериментальной иммуносупрессии. Показано, что при экспериментальной иммуносупрессии введение клеток стафилококка вызывает развитие генерализованной инфекции. Установлено, что в составе микрофлоры вагины мышей происходят изменения, связанные со снижением количества лактобацилл и увеличением количеств стафилококков и представителей семейства энтеробактерий.

O. S. Voronkova, E. A. Sirokvasha, T. N. Polishko, A. I. Vinnikov

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

INFLUENCE OF ADMINISTRATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CELLS SUSPENSION ON COMPOSITION OF VAGINAL MICROFLORA OF MICE UNDER IMMUNOSUPPRESSION

The influence of intravaginal administration of cells of indigenous strain of *Staphylococcus aureus* on composition of vaginal microbiocenosis was studied. It was shown, that under experimental immunosuppression an administration of staphylococci cells makes a development of generalized infection. In composition of vaginal microbiocenosis were found the following changes: the quantity of lactobacilli was decreased and the quantity of staphylococci and representatives of family Enterobacteriaceae was increased.

Вступ

Роль і значимість умовно-патогенних мікроорганізмів у патології людини робить актуальним вивчення їх поширеності та впливу на її здоров'я. Відомо, що індигенна мікрофлора відкритих порожнин має суттєве значення у підтриманні гомеостазу організму.

© О. С. Воронкова, О. А. Сірокваша, Т. М. Полішко, А. І. Вінніков, 2009

У зв'язку з цим склад і біологічна активність бактерій різних біотопів є чинниками підтримання екологічної рівноваги мікробіоценозів відкритих порожнин, серед яких і мікрофлора урогенітального тракту. Порушення мікроекологічної рівноваги різних біотопів призводить до серйозних ускладнень і дисфункції різних систем органів. Крім того, порушення складу мікробіоценозу урогенітального тракту матері здатне впливати на склад мікрофлори дитини: мікроорганізми колонізують організм дитини при проходженні через статеві шляхи матері та при грудному вигодовуванні, що може призвести (за наявності дисбіозу у матері) до виникнення дисбіозу у дитини [1]. Ураження урогенітального тракту (УГТ) насамперед виражаються як дисбіотичний стан, що провокує низку подальших ускладнень (розвиток інфекційної патології, неплідність тощо) [2; 3].

Щодо чинників, які спричиняють дисбіоз саме УГТ, існують два погляди: зниження реактивності імунного статусу жінки, порушення гормонального фону та інші ендогенні фактори, які на тлі несприятливих умов життя дозволяють надмірний розвиток умовно-патогенної мікрофлори порівняно з індигенною мікрофлорою. Друга гіпотеза стверджує, що насамперед надмірне екзогенне навантаження умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами, а також антибіотиками спричиняє розлад у системі мікробіоценозу піхви [4; 12].

Створення моделі на тваринах дозволить з'ясувати більшість нерозкритих питань, тому експериментальна частина даної роботи присвячена аналізам змін мікрофлори піхви мишей за умов уведення їм інтравагінально суспензії клітин індигенного штаму золотистого стафілокока на тлі штучної імуносупресії. Вибір таких експериментальних умов насамперед зумовлений тим, що зараз несприятливі екологічні умови, нездоровий спосіб життя та багато інших факторів призводять до послаблення імунної системи, зникнення адекватної відповіді на інфекційні впливи [11]. До того ж, носійство стафілококів стає все поширенішим за рахунок послаблення імунітету та через те, що мікроорганізми набувають факторів резистентності до антибіотиків та інших несприятливих факторів [1].

Створення експериментальної моделі УГТ дозволить розкрити низку питань щодо механізмів виникнення та розвитку дисбіозу. Загалом така модель також дозволить вивчити склад мікрофлори піхви мишей, про що нами не знайдено відомостей у літературі. Що стосується мікрофлори тваринного організму взагалі – є дані про те, що вона переважно складається з грампозитивних паличок і коків, однак із кишечника та слизових виділяють також кишкову паличку. Молочнокислих бактерій у ШКТ небагато. При годівлі рослинними кормами до складу нормофлори ШКТ починають входити бацили. Відомостей про склад мікробіоценозу УГТ нами не знайдено, тому доречним виявляється його вивчення для розробки подальших моделей на тваринах, що дозволить вивчити механізми, які забезпечують фізіологічну роль індигенної мікрофлори УГТ. Розуміння цих механізмів відкриває шляхи до профілактики запальних захворювань геніталій жінок. З огляду на все наведене вище, мета нашої роботи – оцінити вплив уведення суспензії клітин золотистого стафілокока на склад мікрофлори піхви мишей при імуносупресії.

Матеріал і методи досліджень

Для відтворення імуносупресії використовували препарат «Цитоксан» (Bristol-Myers Squibb, New-York), діючою речовиною якого є циклофосфамід. Препарат вводили шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Згідно з інструкцією [9] щодо застосування препарату розраховано мінімальну дозу та тривалість його введення. Добова доза препарату становила 0,12 мг протягом 14 діб. Препарат вибрано через те, що його імуно-

супресивний ефект у першу чергу спрямований проти проліфервальних клітин і значно більшою мірою, ніж інші, гальмує антитілоутворення [10], що звичайно відбивається на імунитеті слизових. Надалі здійснювали введення суспензій клітин індигенного штаму *S. aureus*. Видову належність штаму визначено за допомогою тест-системи Арі-Staph (Біо-Мер'є, Франція). Для введення тваринам у піхву за допомогою дозатора використовували суспензію (50 мкл), що містила 1×10^6 клітин/мл. Як контроль використовували інтравагінальне введення стерильного фізіологічного розчину (масова доля натрію хлориду 0,5 %), об'єм 50 мкл. Зміни у стані мікробіоценозу піхви спостерігали на 10-ту та 30-ту добу після завершення введення препарату. Отримані дані порівнювали з контролем, який складали інтактні тварини. Для досліджень тварин поділили на дві групи: контроль ($n = 18$) та дослідну групу ($n = 24$).

Матеріал у тварин відбирали уніфікованими стерильними ватними тампонами та проводили змив із них у 1 мл стерильного фізіологічного розчину (масова частка натрію хлориду – 0,5 %). Після цього проводили висів аліквот (по 50 мкл) із нерозведеного матеріалу для виявлення представників родини Enterobacteriaceae на середовище Ендо; для виявлення представників роду *Lactobacillus* на середовища MRS або лактобакагар; для виявлення аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus* та *Enterococcus*) на МПА; для визначення мікроорганізмів роду *Gardnerella* висівали зразок на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) із додаванням лізованої крові (3 %), глюкози (1 %) та триптофану (0,2 %). Для подальшої ідентифікації та вивчення деяких властивостей виділених мікроорганізмів проводили пересіви на середовища Чистовича, МПА із додаванням крові (3 %), на МПА із желатиною (15 %), МПБ із додаванням триптофану та нітратів, на середовища Гіса з індикаторами та цукрами (глюкоза, лактоза, манітол), на лужне середовище, МПА із жовчю (40 %), [4]. За необхідності мікроорганізми культивували в ексикаторі при зниженому парціальному тиску O_2 .

Для визначення анаеробів проводили висів аліквот (по 50 мкл) із розведень змиву 10^{-2} – 10^{-4} на середовища лактобакагар для визначення *Lactobacillus spp.*, на біфідум-агар та середовище Блаурокка для визначення мікроорганізмів роду *Bifidobacterium spp.*, на 5 % кров'яний агар із додаванням нітрату (1 %) та фумарату (1 %) для визначення *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium spp.* та *Fusobacterium spp.*, та за необхідності – на середовище Кітт-Тароцці для накопичення матеріалу [11]. Культивування анаеробів проводили в анаеростаті, заповненому інертним газом.

Ідентифікацію вивчених штамів бактерій проводили за ознаками, наведеними у Визначнику бактерій Берджі [6; 7] та згідно з Наказом МОЗ СРСР «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» від 22.04.1985 р. № 535 [5]. Культури ідентифікували за результатами вивчення морфологічних, тинкторіальних та фізіолого-біохімічних ознак [11].

Кількість мікроорганізмів, виділених із піхви тварин, визначали згідно з наказом МОЗ України «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги» від 15.12.2003 р. № 582 [8] та виражали їх у вигляді $lg M \pm lg m$, де $lg M$ – логарифм середньої кількості колонієтворних одиниць в 1 мл змиву (КУО/мл), а $lg m$ – логарифм помилки середнього.

Для контролю змін показників імунитету у певні періоди здійснювали відбір крові у випадково відібраних з експериментальної групи тварин шляхом декапітації, через що вибірки меншали за кількістю тварин.

Усі дослідження на тваринах проводили з урахуванням норм, установлених законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та норм, прийнятих в Європейській конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 р. [9].

Результати та їх обговорення

За умов створення штучної імуносупресії тваринам додатково проводили інтравагінальне введення суспензії добової культури клітин виділеного штаму, який було ідентифіковано як *S. aureus*. Кількість клітин у суспензії становила 1×10^6 кл./мл. Порівняльний аналіз даних, отриманих для груп 1 (контроль) та 3 (тварини, яким створювали екзогенне мікробне навантаження на тлі імуносупресії, викликаній введенням циклофосаміду) дозволив визначити, що відбувається зростання частоти виділення (рис.) та кількості мікроорганізмів (табл.) більшості з виявлених родів.

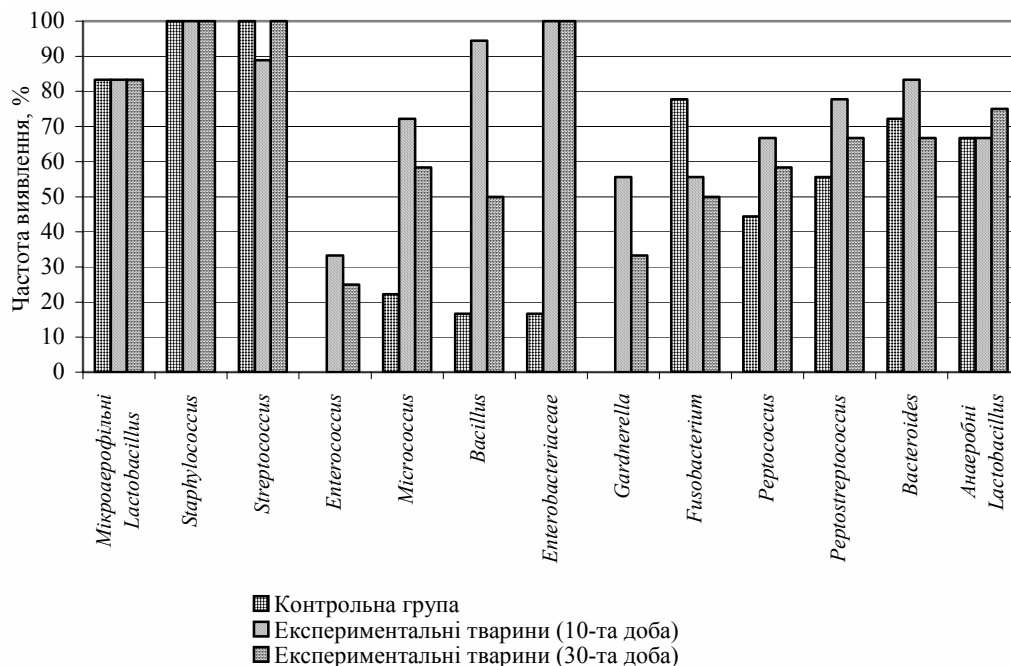


Рис. Частота виявлення мікроорганізмів, виділених із піхви мишей при інтравагінальному введенні суспензії клітин *S. aureus* на тлі імуносупресії

На 10-ту добу досліджень мікроорганізми родів *Enterococcus spp.* та *Gardnerella spp.* у групі 3 виявлено з частотами 33,3 та 55,6 % відповідно. Також порівняно з контролем на 10-ту добу у групі 2 зростає частота виявлення *Micrococcus spp.* (у 3,3 раза), *Bacillus spp.* (у 5,7 раза), представників родини Enterobacteriaceae (у 6,0 раза).

Щодо кількості визначених бактерій, то в групі 3 вона значно вища порівняно з контролем. Найсуттєвіше зростання на 10-ту добу в групі 3 відмічене для мікроорганізмів родів *Staphylococcus spp.* (в 11,8 раза), *Bacillus spp.* (у 14,5 раза), представників родини Enterobacteriaceae (у 19,5 раза), *Streptococcus spp.* (у 3,0 раза). Зниження кількості визначене для мікроаерофільних (в 1,4 раза) та анаеробних (в 1,3 раза) *Lactobacillus spp.* При цьому відмічене зростання кількості облигатно-анаеробних бактерій родів *Peptococcus spp.* (у 6,6 раза), *Peptostreptococcus spp.* (у 9,8 раза), *Fusobacterium spp.* (у 9,1 раза) та *Bacteroides spp.* (в 4,0 раза).

Кількість мікроорганізмів ($lg M \pm lg m$), виділених із піхви тварин дослідних груп

Група бактерій	Мікроорганізми	Період досліджень		
		0-ва доба, (n = 18)	10-та доба, (n = 18)	30-та доба, (n = 12)
Мікроаерофільні	<i>Lactobacillus spp.</i>	2,19 ± 1,26	2,04 ± 1,50*	2,09 ± 1,36*
Факультативно-анаеробні та аеробні	<i>Staphylococcus spp.</i>	2,03 ± 1,39	3,10 ± 2,24*	3,13 ± 2,13*
	<i>Streptococcus spp.</i>	2,51 ± 1,54	2,98 ± 1,99*	2,88 ± 1,92*
	<i>Enterococcus spp.</i>	–	2,12 ± 1,78	1,90 ± 1,60
	<i>Micrococcus spp.</i>	1,85 ± 1,06	2,15 ± 1,84*	1,90 ± 1,66
	<i>Bacillus spp.</i>	1,73 ± 1,06	2,17 ± 1,90*	2,05 ± 1,48*
	Enterobacteriaceae	1,67 ± 1,06	2,96 ± 2,06*	2,95 ± 1,93*
	<i>Gardnerella spp.</i>	–	2,16 ± 1,81	2,18 ± 1,58
Анаеробні	<i>Fusobacterium spp.</i>	3,85 ± 3,01	4,81 ± 4,28*	4,67 ± 4,01*
	<i>Peptococcus spp.</i>	3,78 ± 3,18	4,60 ± 4,28*	4,69 ± 4,20*
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>	3,82 ± 3,13	4,81 ± 4,38*	4,57 ± 4,22*
	<i>Bacteroides spp.</i>	4,63 ± 3,28	5,23 ± 4,52*	5,34 ± 4,62*
	<i>Lactobacillus spp.</i>	4,09 ± 3,27	3,98 ± 3,41*	3,81 ± 3,29*

Примітки: * – дані статистично відрізняються від 0-ї доби ($p < 0,05$); “–” – мікроорганізми не виявлені.

Для мишей при навантаженні циклофосфамідом зі створенням додаткового інтравагінального введення суспензії клітин добової культури індигенного штаму золотистого стафілокока на 10-ту добу спостережень відмічено зміну співвідношення «аероби : анаероби» на користь облигатно-анаеробних бактерій: воно становило приблизно 1 : 92, при такому у контролі – 1 : 53.

При розтині відмічено, що селезінка збільшена, має буро-червоне забарвлення. Гемокультури позитивні (виявлено *S. aureus*). Відбитки селезінки дали ріст на ЖСА, за результатами ідентифікації виявлено *S. aureus*, тобто можна констатувати генералізацію інфекції.

На 30-ту добу, як й у попередній серії досліджень, спостерігали значні розбіжності між групами інтактних і експериментальних тварин. У групі 3 відмічені більші за контрольні частоти виявлення *Enterococcus spp.* (визначені у 25 % тварин проти 0 % у контролі), *Bacillus spp.* (у 3,0 раза), представників родини Enterobacteriaceae (у 6,0 раза).

Порівняно з контролем у групі 3 підвищеними залишалися кількості мікроорганізмів наступних родів: *Staphylococcus spp.* (у 12,6 раза), *Bacillus spp.* (у 2,1 раза), представників родини Enterobacteriaceae (у 19,0 раза). Меншими за норму були кількості мікроаерофільних (в 1,3 раза) та анаеробних (в 1,9 раза) *Lactobacillus spp.* Значно вищими за норму лишалися кількості анаеробних бактерій *Peptococcus spp.* (у 8,1 раза), *Peptostreptococcus spp.* (у 5,6 раза), *Fusobacterium spp.* (у 6,6 раза) та *Bacteroides spp.* (у 5,1 раза).

Висновки

При інтравагінальному введенні суспензії клітин індигенного штаму золотистого стафілокока за імуносупресії у мишей відбувається ініціація та розвиток дисбіотичних явищ у мікробіоценозі піхви, що характеризується зниженням кількості мікроорганізмів роду *Lactobacillus spp.* і зростанням – представників умовно-патогенної флори. При одночасному створенні стану імуносупресії у мишей та інтравагінальному введенні суспензії клітин відбувається генералізація стафілококової інфекції.

На 30-ту добу після припинення введення циклофосфаміду відмічено збереження підвищених кількостей таких факультативно-анаеробних умовно-патогенних

мікроорганізмів як *Staphylococcus spp.* та представників родини Enterobacteriaceae. Порівняно з нормою підвищується кількість мікроорганізмів родів *Enterococcus spp.* та *Bacillus spp.* Кількість мікроаерофільних *Lactobacillus spp.* при цьому меншала порівняно з нормою.

Серед анаеробних мікроорганізмів відмічене значне зростання концентрацій, що перевищує норму. Протягом усього періоду спостережень вищі за норму кількості зафіксовані для анаеробних бактерій родів *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.* та *Bacteroides spp.*

Бібліографічні посилання

1. **Геник Н. І.** Стан мікробіоценозу статевих шляхів при високому ризику інтраамніального інфікування й можливості корекції на сучасному етапі // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2004. – № 3. – С. 104–106.
2. **Иммунный статус**, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений / В. Г. Передерий, А. М. Земсков, Н. Г. Бычкова, В. М. Земсков. – К. : Здоров'я, 1995. – 211 с.
3. **Иммунологическая память** у мышей линий СВА и СВА/Н при вакцинации *Mycobacterium bovis* (BCG) / Б. В. Никоненко, С. В. Хайдуков, И. С. Литвинов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – № 6. – С. 649–651.
4. **Кисина В. И.** Дифференцированный подход к ведению пациенток с различными вариантами течения бактериального вагиноза / В. И. Кисина, Н. А. Полищук, В. М. Говорун // Вестник дерматологии и венерологии. – 2002. – № 5. – С. 15–20.
5. **Об унификации** микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ № 535. – [Чинний від 22.04.1985 р.]. – М. : МОЗ СССР, 1985. – 65 с.
6. **Определитель** бактерий Берджи / Под ред. Д. Хоулта, Н. Криля, П. Синта и др.: в 2 т. – М. : Мир, 1997. – Т. 1. – 1997. – 430 с.
7. **Определитель** бактерий Берджи / Под ред. Д. Хоулта, Н. Криля, П. Синта и др.: в 2 т. – М. : Мир, 1997. – Т. 2. – 1997. – 368 с.
8. **Про затвердження** клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги: наказ № 582. – [Чинний від 15.12.2003 р.]. – К. : МОЗ України, 2003. – 163 с.
9. **Резніков О.** Проблемы этики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О. Резніков // Вісник НАНУ. – 2001. – № 1. – С. 5–7.
10. **Справочник Видаль.** Лекарственные препараты в России. – М. : АстраФармСервис, 1997. – 1504 с.
11. **Якобисяк М.** Імунологія. – Вінниця : Нова книга, 2004. – 672 с.
12. **Medical microbiology** / M. D. Samuel-Baron, R. C. Peake, D. A. James et al. – Galveston : The Texas University Print, 1996. – 606 p.

Надійшла до редколегії 16.11.2009