



УДК 577.27;579;612.017.1;616.1

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

ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІМУНОСУПРЕСІЇ НА РОЗВИТОК ДИСБІОЗУ УРОГЕНІТАЛЬНОГО ТРАКТУ БІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ МИШЕЙ

Дніпропетровський національний університет

Вступ

Бактеріальний вагіноз — це інфекційний незапальний синдром, пов'язаний із дисбіозом піхви, що характеризується високою концентрацією умовно-патогенних мікроорганізмів і значним зниженням або відсутністю лактобацил. Вважається, що обов'язковою умовою для виникнення дисбіозу є наявність конкурентного росту одного або кількох умовно-патогенних мікроорганізмів [4; 7].

Відомо, що імунітет слизових оболонок макроорганізму здебільшого зумовлений секреторними антитілами, які належать до класу імуноглобулінів А. У слизовій оболонці шийки матки у вигляді окремих скупчень розташована чимала кількість плазматичних клітин, що секретують імуноглобуліни [9]. Наявність антитіл відіграє вирішальну роль у протиінфекційному імунітеті статевої системи жінки (особливо під час вагітності). Порушення гомеостазу нормальної мікрофлори значно порушує опірність до колонізації умовно-патогенними мікроорганізмами слизових оболонок [7; 9].

Сьогодні відкритим залишається питання про роль імуно-

супресії у розвитку дисбіотичних станів урогенітального тракту (УГТ). Отже, **метою** нашої роботи було дослідження змін, що виникають у мікробіоценозі УГТ при створенні штучної імуносупресії, яка виникає завдяки дії циклофосфаміду. Останній, як відомо, призводить до порушення диференціації В-клітин у плазматичні клітини, що опосередковує пригнічення імунітету слизової [3; 8; 9].

Матеріали та методи дослідження

Досліди було проведено на самицях білих лабораторних мишей віком 18–20 тиж, масою 18–20 г, яких утримували в умовах, що відповідають стандарту [1]. Усі дослідження на тваринах проводилися згідно з нормами, встановленими законом України, № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» і нормами, прийнятими Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей від 20.09.1985 р. [6].

Як імуносупресор застосовували препарат «Цитоксан» (Bristol-Myers Squibb, New-York), діючою речовиною якого є циклофосфамід (надалі цикло-

фосфамід). Для створення імуносупресії використовували курс внутрішньом'язової ін'єкції препарату. Згідно з інструкцією [8] щодо застосування препарату, було розраховано мінімальну дозу та тривалість введення препарату. Так, добова доза препарату становить 0,12 мг протягом 14 днів. Цей лікарський засіб було обрано тому, що його імуносупресивний ефект у першу чергу спрямований проти проліферуючих клітин, і, значно більшою мірою, ніж інші, він гальмує антитілоутворення [9].

Зміни стану мікробіоценозу УГТ спостерігали на 15-й та 30-й день після завершення курсу введення препарату. Отримані дані порівнювали з контролем, яким служили інтактні тварини.

Відповідно до мети досліджень тварин було поділено на 2 групи:

— група 1 (контроль) — інтактні тварини (n=15);

— група 2 — тварини, яким вводили циклофосфамід (n=20). На 30-й день чисельність цієї групи зменшується, тому що на 15-й день 5 тварин умертвили для отримання крові.

Матеріал у тварин брали уніфікованим стерильним ватним тампоном і проводили змив із



Частота виділення мікроорганізмів
з урогенітального тракту
тварин дослідних груп, абс./%

Мікроорганізми	Група 1, n=15	Група 2	
		15-й день, n=20	30-й день, n=15
Мікроаерофільні <i>Lactobacillus sp.</i>	13/86,7	14/70	9/60
Факультативно-анаеробні й аеробні бактерії			
<i>Staphylococcus sp.</i>	15/100	20/100	15/100
<i>Streptococcus sp.</i>	15/100	20/100	15/100
<i>Enterococcus sp.</i>	0/0	6/30	8/53,3
<i>Micrococcus sp.</i>	3/20	10/50	4/26,7
<i>Bacillus sp.</i>	2/13,3	16/80	4/26,7
<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	3/20	19/95	15/100
<i>Gardnerella sp.</i>	0/0	5/25	7/46,7
Анаеробні бактерії			
<i>Fusobacterium sp.</i>	12/80	17/85	10/66,7
<i>Peptococcus sp.</i>	7/46,7	12/60	7/46,7
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	9/60	13/65	6/40
<i>Bacteroides sp.</i>	12/80	11/55	11/73,3
Анаеробні <i>Lactobacillus sp.</i>	10/66,7	14/70	8/53,3

нього в 1 мл стерильного фізіологічного розчину (масова частка натрію хлориду 0,5 %). Після цього висівали аліквоти (по 50 мкл) з нерозведеного матеріалу та з розведень 10^{-1} – 10^{-2} на МПА, середовища Ендо, MRS, біфідум-агар, шоколадний агар, на 5%-й кров'яний агар із додаванням нітрату та фумарату, на МПБ — із додаванням лізованої крові, глюкози та триптофану, а також на середовище Кітт — Тароцці [10].

Ідентифікацію штамів бактерій, що вивчаються, проводили згідно з переліком ознак, наведених у роботі [5]. Культивування анаеробів проводили за допомогою анаеростату, заповненого інертним газом.

Титри мікроорганізмів виражали у вигляді

$$\lg M \pm \lg m,$$

де $\lg M$ — логарифм середньої кількості колонієутворювальних одиниць у мілілітрі (КУО/мл); $\lg m$ — логарифм помилки середнього.

Статистичну обробку результатів проводили за методикою, запропонованою Лакінім [2], використовуючи t-критерій Стьюдента при рівні значущості 0,05.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідів наводяться у табл. 1 і 2. Дані, отримані на 15-ту та 30-ту добу після завершення курсу циклофосфаміду, подаються у порівнянні з контролем.

При порівнянні групи 2 із контролем очевидним є зростання частоти виділення та кількості мікроорганізмів більшості з визначених родів. Так, у жодної тварини з інтактних мишей не визначено мікроорганізмів родів *Enterococcus sp.* і *Gardnerella sp.*, тимчасом як на 15-й день досліджень у групі 2 обидва ці мікроорганізми виявлені з частотою 30 і 25 % відповідно. Також порівняно з контролем на 15-й день у групі 2 зростає частота зустрічальності *Micrococcus sp.* (у 2,50 рази),

Титр мікроорганізмів, виділених
з урогенітального тракту
тварин дослідних груп, $\lg M \pm \lg m$

Мікроорганізми	Група 1, n=15	Група 2	
		15-й день, n=20	30-й день, n=15
Мікроаерофільні <i>Lactobacillus sp.</i>	2,16±1,39	2,01±1,41	1,87±1,15*
Факультативно-анаеробні й аеробні бактерії			
<i>Staphylococcus sp.</i>	2,03±1,21	2,92±1,51*	2,67±1,30*
<i>Streptococcus sp.</i>	2,52±1,37	2,95±1,48*	2,61±1,46
<i>Enterococcus sp.</i>	—	1,87±1,21	1,70±1,18
<i>Micrococcus sp.</i>	1,82±1,06	1,91±1,30	1,88±1,00
<i>Bacillus sp.</i>	1,70±1,15	2,04±1,25	2,00±1,21
<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	1,67±1,06	2,96±1,50*	2,68±1,39*
<i>Gardnerella sp.</i>	—	1,92±1,22	1,80±1,14
Анаеробні бактерії			
<i>Fusobacterium sp.</i>	3,88±2,30	4,73±3,54*	4,63±3,55*
<i>Peptococcus sp.</i>	3,80±2,56	4,95±3,59*	4,66±3,53*
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	3,74±2,57	4,97±3,72*	4,67±3,59*
<i>Bacteroides sp.</i>	3,97±2,60	4,96±3,56*	5,17±3,58*
Анаеробні <i>Lactobacillus sp.</i>	3,97±2,36	4,97±3,38*	4,70±3,49*

Примітка. * — Статистично вірогідні відмінності порівняно з контролем.

Bacillus sp. (у 6,01 разу), представників родини *Enterobacteriaceae sp.* (у 4,75 разу). Зниження частоти зустрічальності зафіксоване лише для мікроорганізмів роду *Lactobacillus sp.* (у 1,24 разу) та *Bacteroides sp.* (в 1,45 разу).

Щодо кількості визначених бактерій, то у групі 2 вона значно вища порівняно з контролем. Так, найбільш суттєве зростання на 15-й день у групі 2 відмічено для мікроорганізмів родів *Staphylococcus sp.* (у 7,76 разу), *Bacillus sp.* (у 2,19 разу), пред-



ставників родини *Enterobacteriaceae sp.* (у 19,50 рази), *Streptococcus sp.* (у 2,69 разу). Зниження кількості визначалось у мікроаерофільних *Lactobacillus sp.* (в 1,41 разу). При цьому відмічено зростання кількості облигатно-анаеробних бактерій родів *Peptococcus sp.* (у 13,80 разу), *Peptostreptococcus sp.* (у 16,98 разу), *Fusobacterium sp.* (у 7,08 разу), *Lactobacillus sp.* (у 10,0 разів) та *Bacteroides sp.* (у 9,77 разу).

При навантаженні циклофосфамідом на 15-й день після завершення введення препарату у мишей встановлено зміни співвідношення аероби : анаероби на користь облигатно-анаеробних бактерій, воно становить приблизно 1 : 135, а у контролі — 1 : 50.

При розвитку бактеріально-го вагінозу відношення аеробів до анаеробів у людини становить близько 1 : 1000 [4; 7].

Після припинення дії препарату очікувалася нормалізація стану мікрофлори УГТ, однак навіть на 30-й день ми спостерігали значні розбіжності між групою інтактних тварин і мишами, яких піддавали дії імуносупресора. Так, у групі 2 відмічено більші за контрольні частоти зустрічальності для *Enterococcus sp.* (визначені у 53,3 % тварин проти 0 % у контролі), *Bacillus sp.* (у 2,01 разу), представників родини *Enterobacteriaceae sp.* (у 5,00 разів).

Порівняно з контролем, у групі 2 підвищеними залишаються титри мікроорганізмів таких родів: *Staphylococcus sp.* (у 4,37 разу), *Bacillus sp.* (у 2,00 рази), представників родини *Enterobacteriaceae sp.* (у 10,23 разу). Меншим за норму є титр мікроаерофільних *Lactobacillus sp.* (в 1,95 разу). Значно вищими за норму залишаються титри анаеробних бактерій: *Peptococcus sp.* (у 7,24 разу), *Peptostreptococcus sp.* (у 8,51 разу), *Fusobacterium sp.* (у 5,62 разу), *Lactobacillus sp.* (у 5,37 разу) та *Bacteroides sp.* (у 15,84 разу).

Кількість облигатно-анаеробних мікроорганізмів суттєво зростає і на 30-й день співвідношення аероби : анаероби становить близько 1 : 195, що є ознакою розвитку дисбіотичного стану поряд із зниженням кількості мікроаерофільних лактобацил і зростанням кількості умовно-патогенних мікроорганізмів.

Отже, за умов дії циклофосфаміду у мишей формується домінування облигатних анаеробів (роди *Fusobacterium sp.*, *Peptococcus sp.*, *Peptostreptococcus sp.* і *Bacteroides sp.*) та умовно-патогенної флори (бактерії роду *Staphylococcus sp.* і представники родини *Enterobacteriaceae sp.*). У значних кількостях також виявляють мікроорганізми родів *Enterococcus sp.* та *Bacillus sp.*

У людини при розвитку дисбіотичних явищ частіше за все виявляють представників роду *Staphylococcus sp.*, крім того *Corynebacterium sp.*, асоціацію *Bacteroides sp.* і *Prevotella sp.* У значно менших концентраціях трапляються представники родів *Micrococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Veilonella sp.*, *Eubacterium sp.* Також виділяють представників родів *Clostridium sp.*, *Actinomyces sp.*, *Fusobacterium sp.*, видів *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli* та інших колиформних бактерій [7; 10].

Висновки

1. Введення циклофосфаміду призводить до розвитку дисбіотичних явищ в УГТ, що характеризується зміною відношення аероби : анаероби, яке на 15-й день після припинення курсу введення препарату становить близько 1 : 135, а на 30-й — 1 : 195, тимчасом як у контрольній групі тварин воно дорівнює — 1 : 50. Водночас відмічається зниження титру мікроорганізмів, що належать до мікроаерофільних *Lactobacillus sp.*, та зростання титру бактерій — представників умовно-патогенної флори.

2. На 30-й день після припинення курсу циклофосфаміду відмічено збереження підвищених титрів таких факультативно-анаеробних умовно-патогенних мікроорганізмів, як *Staphylococcus sp.*, та у представників родини *Enterobacteriaceae sp.*, які відповідно становлять на 30-й день (2,67±1,30) та (2,68±1,39) Ig КУО/мл. Також порівняно з нормою підвищеними є титри мікроорганізмів родів *Enterococcus sp.* і *Bacillus sp.*, що відповідно становлять на 30-й день (1,70±1,18) та (2,00±1,21) Ig КУО/мл. Титр мікроаерофільних *Lactobacillus sp.* при цьому зменшується порівняно з нормою і на 30-й день становить (1,87±1,15) Ig КУО/мл.

3. Серед анаеробних мікроорганізмів відмічено значне зростання титрів, що значно перевищує норму. На 15-й день для анаеробних бактерій родів *Peptococcus sp.* (у 13,80 разу), *Peptostreptococcus sp.* (у 16,98 разу), *Fusobacterium sp.* (у 7,08 разу), *Lactobacillus sp.* (у 10,00 разів) і *Bacteroides sp.* (у 9,77 разу); на 30-й день для облигатно-анаеробних бактерій титри також значно перевищують норму: *Peptococcus sp.* (у 7,24 разу), *Peptostreptococcus sp.* (у 8,51 разу), *Fusobacterium sp.* (у 5,62 разу), *Lactobacillus sp.* (у 5,37 разу) та *Bacteroides sp.* (у 15,84 разу).

Дослідження виконано в межах реалізації гранта Президента України для обдарованої молоді, розпорядження № 19/2007-рп від 30.01.2007 р.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте* / Под ред. И. П. Западнюка и др. — К.: Вища шк., 1983. — 383 с.
2. *Лакін Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 293 с.
3. *Чувствительность* иммунокомпетентных клеток мышей линии DBA/2 и C57BL/6 к циклофосфану / Н. В. Масная, А. А. Чуринов, О. С. Борсук, Е. Ю. Шерстобоев // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. — 2003. — № 4. — С. 427-431.



4. Назарова Е. К., Гиммельфарб Е. И., Созаева Л. Г. Микробиоценоз влагаліща и его нарушения // Клин. лабор. диагностика. — 2003. — № 2. — С. 25-32.

5. *Определитель* бактерий Берджи: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Криля, П. Синта и др. — В 2-х т. — М.: Мир, 1997. — Т. 1 — 430 с.; Т. 2 — 368 с.

6. Резніков О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5-7.

7. Сидорова И. С., Воробьев А. А., Боровкова Е. И. Микробиоценоз половых путей женщин репродуктивного возраста // Акушерство и гинекология. — 2005. — № 2. — С. 7-9.

8. *Справочник* Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник. — М.: АстраФармСервис, 1997. — 1504 с.

9. *Якобияк* М. Імунологія. — Вінниця: Нова книга, 2004. — 672 с.

10. Samuel Baron M. D. et al. *Medical microbiology Galveston: The Texas University Print*, 1996. — 606 p.

УДК 577.113:591.481.1-001:615.35

О. В. Садовник

ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ПРОФІЛЬ У ЩУРІВ НА ФОНІ ТРАВМАТИЧНОЇ ХВОРОБИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ І ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ КОРВІТИНОМ

Луганський державний медичний університет

Загальновідомо, що невід'ємною ланкою патогенезу закритої черепно-мозкової травми (ЗЧМТ) є порушення енергозабезпечення нервових клітин, яке максимально виражене на фоні посттравматичної нейрональної гіпоксії [1; 2]. Проявом енергодефіциту в умовах даного екстремального стану є зниження швидкості аеробного окиснення біологічних субстратів і перехід метаболізму головного мозку на менш ефективний шлях утворення енергії — анаеробний гліколіз [3–6]. Крім того, в умовах кисневого голодування при травматичній хворобі головного мозку (ТХГМ) порушуються процеси енергосинтезу в системі мітохондріального окисного фосфорилування, що виявляється зниженням рівня макроергів й обумовлює ушкодження структур мозку та порушення основних його функцій [7–12]. Поза сумнівом, причиною такого роду обставин є відсутність високоефективних і безпечних засобів фармакологічної корекції церебральної патології травматичного генезу, особливо це стосується адекватного медикаментозного за-

безпечення у гострому періоді ТХГМ.

Згідно з сучасними уявленнями про патогенез травматичного ушкодження головного мозку, необхідно виділити такі основні його вектори, як порушення мозкового кровотоку й активацію метаболічних процесів у нейронцитах, які потребують відповідної патогенетично виправданої фармакокорекції, бажано за допомогою засобів, що вирізняються багатогранністю фармакодинамічних ефектів. До таких засобів по праву належить кверцетин, на основі якого створено препарат корвітин.

Виходячи з цього, **метою** дослідження було вивчення впливу корвітину на енергетичний гомеостаз організму щурів із ЗЧМТ у динаміці.

Матеріали та методи дослідження

Досліди проведені на білих нелінійних щурах обох статей масою 160–180 г у лабораторії кафедри фармакології Луганського державного медичного університету, сертифікованій Державним фармакологічним Центром (ДФЦ) МОЗ України

(свідоцтво № 07 від 29 вересня 2005 р.) у повній відповідності з методичними рекомендаціями ДФЦ [13].

Експериментальною моделлю слугував патологічний процес, що розвивається на фоні ЗЧМТ, яку моделювали за допомогою спеціального пристрою оригінальної конструкції [14].

Усіх тварин було поділено на 4 групи: інтактну, контрольну, дослідну та референтну. Щурам дослідної серії фармакокорекцію невідкладного стану, що моделюється, проводили корвітином (виробництво ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна) за умов його внутрішньоочеревинного введення у вигляді 1 % водного розчину дозою 100 мг/кг у такому режимі: у першу добу — через 30 хв після нанесення дозованого удару, а в останні 5 діб — щодня вранці. Як препарат порівняння було обрано ноотропіл (виробництво ЮСБ С. А. Фарма Сектор, Бельгія), який тварини референтної групи одержували в дозовому режимі, аналогічному прийому корвітину. Контрольній серії щурів

