

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН СТРУКТУРИ БІОТОПУ УРОГЕНІТАЛЬНОГО ТРАКТУ ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ІНТРАНАЗАЛЬНІЙ ДІЇ НІТРОКСОЛІНУ

Яськів Г.І., Платонова І.Л., Альохіна Т.А.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького м. Львів, Україна

Анотація. Вивчення особливостей змін структури біотопу урогенітального тракту самок щурів при хронічній інтраназальній дії нітроксоліну проводили при концентраціях впливу речовини: 5 мг/м³ – перша група, 15 мг/м³ – друга та 45 мг/м³ – третя група. У тварин першої групи (5 мг/м³) внаслідок тривалого впливу сполуки відмічали незначні відхилення у структурі мікробіоти піхви з повним самовідновленням структури упродовж відновного періоду. Хронічна інтраназальна дія нітроксоліну у діапазоні концентрацій 15 мг/м³ – 45 мг/м³ проявляла виражену дисбіотичну дію. У порівнянні з фоновими показниками спостерігали зменшення у 3 рази частоти виявлення біфідобактерій, витіснення з екотопу грам позитивних коків та грам від'ємних паличок, у 37,5% тварин виявляли наявність міцеліальної грибової колонізації. У реабілітаційний період повного відновлення структури мікроценозу урогенітального тракту не наступало.

Концентрація нітроксоліну 5 мг/м³ при тривалій інгаляційній дії є пороговою для дисбіотичної дії, а 15 мг/м³ діючою за цим ефектом.

Ключові слова: *нітроксолін, хронічна інгаляційна дія, мікробіоценоз, урогенітальний тракт.*

Вступ Нітроксолін - синтетичний уроантисептик, ефективний щодо широкого спектру грампозитивних, грамнегативних бактерій і грибів. Упродовж тривалого часу використовується для лікування та профілактики гострих, хронічних і рецидивуючих інфекцій сечовивідних шляхів [1]. В умовах виробництва нітроксолін поступає в повітря робочої зони і може негативно впливати на організм працюючих, зокрема на екобіотопи людини.

Мікрофлора будь якого біотопу, не виключення мікробіоценоз урогенітального тракту (піхви), є мінливою структурою в якій кількість визначених типів мікроорганізмів коливається в межах змін умов середовища їх перебування. У процесі регуляції мікробіоценозу піхви центральне місце належить лакто- і біфідобактеріям, які продукують різні інгібітори (бактеріоцини, бактеріоциноподібні речовини) здатні пригнічувати ріст інших бактерій, створювати та підтримувати колонізаційну резистентність у піхві. Вони колонізують епітеліоцити піхви, вкриваючи стінку своєрідною біоплівкою. Це запобігає контамінації статевих шляхів екзогенними мікроорганізмами та обмежує надлишкове розмноження інших родів бактерій (дріжджів, міцеліальних грибів, гарднерел, клебсіел, ешеріхій, стафілококів та ін.) [2-6].

Крім того, мікробіоценоз є своєрідною індикаторною системою здатною реагувати якісними та кількісними зрушеннями на фізіологічні, патологічні зміни в макроорганізмі. Умови навколишнього середовища, стресові впливи, тривале й безконтрольне застосування антибіотиків, хронічні захворювання та дисфункція шлунково-кишкового тракту, гормональні порушення, імунна недостатність, дія різних фізичних чи хімічних впливів та ін. обумовлюють порушення динамічної рівноваги в системі ендogenous нормоценозу організму й виступають основними ендogenous та екзогенними факторами, що сприяють формуванню дисбіотичних порушень. Дія хімічних чинників на виробництві лікарських засобів (ЛЗ), зокрема наділених антибактеріальними властивостями, виступає основним екзогенним фактором, що сприяє формуванню дисбіотичних процесів [7-9]. У рамках розробки гігієнічного нормативу допустимого вмісту нітросоліну в повітрі робочої зони виробничих приміщень нами проведено вивчення дисбіотичної дії нітросоліну на мікробіоту урогенітального тракту самок щурів при інгаляційному шляху поступлення в концентраціях на рівні його порогу хронічної інгаляційної дії.

Мета дослідження. Вивчити особливості змін структури біотопу урогенітального тракту самок щурів при хронічній інтраназальній дії нітросоліну для встановлення порогу дисбіотичної дії.

Матеріали та методи досліджень. У експерименті використано 4 групи нелінійних щурів самок, 3 дослідні (по 10 особин кожна) та 1 контрольна (6 тварин), які утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету (ЛНМУ) на стандартному харчовому раціоні, згідно з правилами “належної лабораторної практики” (GLP). Дослідження на тваринах проводили при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.), Директиви Ради Європи 2010/63/EU, Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Розрахунковий поріг хронічної інгаляційної дії нітросоліну становить 15 мг/м^3 . Тварин піддавали впливу ЛЗ в концентраціях - 15 мг/м^3 (на рівні розрахункового порогу хронічної дії), 45 мг/м^3 (надпорогова концентрація) та 5 мг/м^3 (підпорогова концентрація).

Для моделювання інгаляційного шляху надходження дослідним тваринам щоденно інтраназально, упродовж 30 днів за допомогою м'якого зонду вводили 0,2 мл суспензії нітросоліну розбавленого стерильним 0,9 % розчином хлориду натрію (NaCl) у дозах, що відповідали концентраціям ЛЗ 5 мг/м^3 – перша група, 15 мг/м^3 – друга та 45 мг/м^3 – третя дослідна група. Тваринам контрольної групи вводили 0,2 мл 0,9 % NaCl.

Біоматеріал для мікробіологічних досліджень біотопу урогенітального шляху самок щурів забирали у перший день (перед початком експерименту, фонові показники), на 15-ий,

30-ий день введення ЛЗ та через 1 місяць після відміни препарату (період відновлення) з дотриманням правил асептики та антисептики, стерильним ватним тампоном, попередньо роблячи мазки для мікроскопічних досліджень. Згодом ватний тампон поміщали у стерильну пробірку з 1 мл 0,9 % розчину NaCl для проведення подальших бактеріологічних досліджень. 50 мкл змиву з пробірки висівали на відповідні селективні середовища.

Культивування мікроорганізмів, дослідження ферментативних властивостей здійснювали згідно загальноприйнятих методик. Фарбування мазків проводили за методом Грама та по Романовському-Гімза, мікроскопування - при збільшенні у 1000 разів у 100 полях зору. Ідентифікацію культур здійснювали шляхом верифікації морфологічних, тинкторіальних властивостей мікроорганізмів.

Для статистичного аналізу вихідних даних, математичних розрахунків використано програмне забезпечення Excel з пакету прикладних програм Microsoft Office з обчисленням середніх величин (M), похибки вибіркового дослідження (абсолютна похибка m), середньоквадратичного відхилення (σ), коефіцієнта (t) та різниці вірогідності (p) за таблицею Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Дослідження показали, що домінантними представниками біотопу урогенітального тракту щурів є лакто- та біфідобактерії. *Lactobacillus* spp. виявлені у 100,0 % особин. Частота зустрічностей *Bifidobacterium* spp. становила 92,5 %. Представників інших видів мікроорганізмів виявляли значно рідше. Наявність грам від'ємних коків відмічали у 53 % особин. Із грам позитивних коків, частота виявлення *Streptococcus* spp. становила 36,9 %, *Staphylococcus* spp. – 11,9 %, *Enterococcus* spp. – 4,2 %. Частота виявлення грам від'ємних паличок складала – 39,9 %, *Bacteroides* spp. – 7,2 %, дріжджів – 9,5 %. Міцеліальних грибів в урогенітальному біотопі інтактних тварин не виявляли.

Бактеріологічні дослідження мікроценозу урогенітального тракту самок щурів, які упродовж місяця піддавали інтраназальному впливу нітросоліну у концентраціях: 5 мг/м³, 15 мг/м³ та 45 мг/м³ виявили зміни у структурі біотопу піхви тварин. Причому, зі зростанням концентрації діючої речовини, починаючи з 15 мг/м³ (друга дослідна група), частота зустрічності певних штамів мікроорганізмів суттєво відрізнялася від фонових значень та показників отриманих у інтактних тварин (табл.).

Таблиця.

Особливості змін мікробіологічної структури біотопу урогенітального тракту щурів при хронічній інтраназальній дії нітроксоліну

Мікроорганізми (у %)	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Грам(-) коки	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	Грам(-) палички	<i>Bacteroides</i> spp.	Гриби	<i>Candida</i> spp.
Групи тварин										
Контрольна група (інтактні тварини, 0,9 % NaCl, n=6)										
1-й день	6/ 100,0	6/ 100,0	2/ 33,3	0/ 0	3/ 50,0	0/ 0	1/ 16,7	1/ 16,7	0/ 0	0/ 0
15-й день	6/ 100,0	6/ 100,0	4/ 66,7	1/ 16,7	2/ 33,3	0/ 0	2/ 33,3	1/ 16,7	0/ 0	0/ 0
30-й день	6/ 100,0	5/ 83/3	5/ 83,3	1/ 16,7	1/ 16,7	0/ 0	3/ 50,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0
віднов.період (1 міс.)	6/ 100,0	6/ 100,0	3/ 50,0	0/ 0	2/ 33,3	1/ 16,7	1/ 16,7	1/ 16,7	0/ 0	1/ 16,7
Перша дослідна група (5 мг, n=8)										
1-й день	8/ 100,0	7/ 89,1	3/ 37,5	1/ 12,5	3/ 37,5	0/ 0	4/ 50,0	0/ 0	0/ 0	1/ 12,5
15-й день	8/ 100,0	6/ 75,0	6/ 75,0	1/ 12,5	4/ 50,0	0/ 0	3/ 37,5	0/ 0	0/ 0	2/ 25,0
30-й день	8/ 100,0	8/ 100,0	8/ 100,0	0/ 0	1/ 12,5	0/ 0	2/ 25,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0
віднов.період (1 міс.)	8/ 100,0	7/ 89,1	5/ 62,5	4/ 50,0	4/ 50,0	1/ 12,5	2/ 25,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0
Друга дослідна група (15 мг, n=8)										
1-й день	8/ 100,0	8/ 100,0	3/ 37,5	2/ 25,0	4/ 50,0	0/ 0	4/ 50,0	0/ 0	0/ 0	2/ 25,0
15-й день	8/ 100,0	5/ 62,5	2/ 25,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	2/ 25,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0
30-й день	8/ 100,0	3/ 37,5	4/ 50,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	3/ 37,5	0/ 0
віднов.період (1 міс.)	8/ 100,0	1/ 12,5	7/ 89,1	8/ 100,0	8/ 100,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0
Третя дослідна група (45 мг, n=8)										
1-й день	8/ 100,0	6/ 75,0	5/ 62,5	1/ 12,5	3/ 37,5	1/ 12,5	5/ 62,5	0/ 0	0/ 0	1/ 12,5
15-й день	8/ 100,0	2/ 25,0	4/ 50,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	1/ 12,5	0/ 0
30-й день	8/ 100,0	2/ 25,0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	4/ 50,0	3/ 37,5	0/ 0
віднов.період (1 міс.)	8/ 100,0	2/ 25,0	4/ 50,0	3/ 37,5	3/ 37,5	2/ 25,0	4/ 50,0	0/ 0	1/ 12,5	1/ 12,5

Тривала інтраназальна дія нітроксоліну в концентрації 15 мг/м³ сприяла зменшенню у 2,7 раза частоти виявлення *Bifidobacterium spp.*, зростанню в 1,3 раза частоти зустрічностей грам від'ємних коків, абсолютній санації піхви від грам позитивних коків, грам від'ємних паличок, дріжджів. У 37,5 % особин констатували появу міцеліальних грибів. Упродовж одномісячного відновлювального періоду динаміка змін у мікробній асоціації біотопу змістилася у бік зростання грам позитивних кокових бактерій, частота виявлення яких, у порівнянні з фоном, зростала: *Staphylococcus spp.* - у 4,0 рази, *Streptococcus spp.* – у 2,0 рази, грам від'ємні коки – у 2,3 раза. Дані види мікроорганізмів були наявні практично у всіх особин даної групи: у 100,0 %, 100,0 % і 89,1 % тварин, відповідно. Натомість частота зустрічності *Bifidobacterium spp.* у мікробіоті зменшувалася у 8 разів, зі 100,0 % до 12,5 %.

У експериментальних тварин третьої дослідної групи з хронічною інтраназальною дією нітроксоліну у концентрації 45 мг/м³ динаміка змін у структурі біотопу була близькою до тварин другої дослідної групи. Через місяць, після припинення дії лікарського засобу частота виявлення більшості мікробних популяцій у особин 3-ї групи наближалася до вихідних значень. Виключення склали біфідобактерії, частота виявлення яких, відносно початкових значень, була у 3 рази нижчою у порівнянні з фоном і становила 25,0 %, відносно 75,0 %. Також у мікробіоті уrogenітального тракту у 12,5 % самок щурів виявляли міцелій грибів та дріжджі.

Висновки та перспективи. Уrogenітальна мікробіота здорових самок щурів об'єднувала конгломерати молочно-кислих бактерій, грам негативних, грам позитивних коків, грам від'ємних паличок. Домінантними представниками біотопу піхви були: *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.*, частота виявлення яких складала 100,0 % та 92,5 %. Частота зустрічностей грам від'ємних коків у мікробіоті дорівнювала 53%, *Streptococcus spp.* – 36,9 %, *Staphylococcus spp.* – 11,9 %, дріжджів - 9,5 %, *Bacteroides spp.* - 7,2 %, *Enterococcus spp.* - 4,2 %.

Хронічний інтраназальний вплив лікарського засобу у пороговій (15 мг/м³) та надпороговій (45 мг/м³) концентраціях викликав дисбіотичні порушення структури біотопу піхви. Вираженість змін була прямо пропорційна часу та концентрації діючої речовини.

Тривала дія нітроксоліну у діапазоні концентрацій 15 мг/м³ – 45 мг/м³ проявляла виражену дисбіотичну дію. Обумовлювала зниження у 3 рази частоти виявлення біфідобактерій, витіснення з екоотопу грам позитивних коків та грам від'ємних паличок, у 37,5 % тварин сприяла появі міцеліальної грибової колонізації. У реабілітаційний період повного відновлення структури мікроценозу уrogenітального тракту не наступало.

Встановлено, що концентрація нітроксоліну 5мг/м³ при субхронічній інтраназальній дії викликає помірні дисбіотичні зміни структури біотопу уrogenітального тракту у щурів з повним її самовідновленням упродовж відновного періоду та є пороговою за дисбіотичною

дією для урогенітального тракту, а 15 мг/м³ діючою за цим ефектом

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Нітроксолін. Інструкція: Наказ МОЗ України від 08.07.2015 № 418, реєстраційне посвідчення № UA/3518/01/01.
2. Бабенко Л.П. Перспективи використання самиць білих лабораторних мишей у якості моделі для вивчення дисбіотичних порушень урогенітального тракту /Л.П Бабенко, В.В. Мокрозуб //Вісник Донецького національного університету, Сер. А: Природничі науки. – 2009. – Вип. 1. – С. 331 – 335.
3. Бондарюк Н.Д. Нормальна мікрофлора порожнини піхви та її зміни в жінок в різні вікові періоди. – 2007. – №4(11). – С. 128 – 131.
4. Cadieux P., Burton J.Kang C.Y. et al. Lactobacillus strains and vaginal ecology // *JAMA*. – 2002. – № 287. – P. 1940–1941.
5. Старішко О.М. Особливості складу мікрофлори урогенітального тракту у жінок /О.М. Старішко //Вісник проблем біології і медицини. – 2017. – вип.1(135). – С. 59 – 63.
6. Воронкова О.С. Нормальна мікрофлора урогенітального тракту та її роль у підтриманні імунітету слизових оболонок /О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Полішко, А.І. Вінніков //Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2008. – Вип. 16, Т. 1. – С. 51 – 56.
7. Рищук С.В. Эндогенная микробиота влагалища и ее нарушение. Диагностика и принципы коррекции /С.В. Рищук, А.А. Малышева // *TERRA MEDIKA*. – 2014. – № 2. – С. 9–21.
8. Воронкова О.С. Екологічна рівновага мікробіоценозу урогенітального тракту мишей в умовах навантаження антибіотиками [електронний ресурс]. – 2008. – Режим доступу: <http://www.dovkil-zdorov.kiev.ua/env/45-0068.pdf>.
9. Воробьев А.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины //А.А. Воробьев, Н.А. Абрамов, В.М. Бондаренко, Б.А. Шендеров // *Вестник РАМН*. – 2007. – №11. – С. 12–18.

REFERENCES

1. Nitroksolin. Instruktsiia: Nakaz MOZ Ukrainy vid 08.07.2015 № 418, reiestratsiine posvidchennia № UA/3518/01/01.
2. Babenko L.P. Perspektyvy vykorystannia samyts bilykh laboratornykh myshei u yakosti modeli dlia vyvchennia dysbiotychnykh porushen urohenitalnoho traktu /L.P Babenko, V.V. Mokrozub // *Visnyk Donetskoho natsionalnoho universytetu, Ser. A: Pryrodnychi nauky*. – 2009. – Vyp. 1. – S. 331 – 335.
3. Bondariuk N.D. Normalna mikroflora porozhnyny pikhvy ta yii zminy v zhinok v rizni vikovi periody. – 2007. – №4(11). – S. 128–131.
4. Cadieux P., Burton J.Kang C.Y. et al..Lactobacillus strains and vaginal ecology // *JAMA*. – 2002. –

№ 287. – P. 1940–1941.

5. Starishko O.M. Osoblyvosti skladu mikroflory urogenitalnoho traktu u zhinok /O.M. Starishko // *Visnyk problem biologii i medytsyny*. – 2017. – vyp.1 (135). – S.59–63.
6. Voronkova O.S. Normalna mikroflora urogenitalnoho traktu ta yii rol u pidtrymanni imunitetu slyzovykh obolonok /O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha, T.M. Polishko, A.I. Vinnikov // *Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Biologiya. Ekologiya*. – 2008. – Vyp. 16, T. 1. – S. 51–56.
7. Ryshchuk S.V. Endohennaia mykrobyota vlahalyscha y ee narushenye. Dyahnostyka y pryntsyry korrektsyy /S.V. Ryshchuk, A.A. Malysheva // *TERRA MEDIKA*. – 2014. – № 2. – S. 9–21.
8. Voronkova O.S. Ekolohichna rivnovaha mikrobiotsenozu urogenitalnoho traktu myshei v umovakh navantazhennia antybiotykyamy [elektronnyi resurs]. – 2008. – Rezhym dostupu: <http://www.dovkil-zdorov.kiev.ua/env/45-0068.pdf>.
9. Vorobev A.A. Dysbakteryozы – aktualnaia problema medytsyny //A.A. Vorobev, N.A. Abramov, V.M. Bondarenko, B.A. Shenderov // *Vestnyk RAMN*. – 2007. – №11. – S. 12–18.,

FEATURES OF CHANGES IN THE BIOTOPE OF THE RAT UROGENITAL TRACT WITH CHRONIC INTRANASAL EFFECT OF NITROXOLINE

Yaskiv A.I., Platonova I.L., Alekhina T.A.

Annotation. The study of the peculiarities of changes in the structure of the biotope of the urogenital tract of female rats under chronic intranasal action of nitroxoline was carried out at the concentration of exposure to the substance: 5 mg/m³ - the first group, 15 mg/m³ - the second, and 45 mg/m³ - the third group. In animals of the first group (5 mg/m³), as a result of prolonged exposure to the compound, slight deviations in the structure of the vaginal microbiota were noted with its complete self-restoration during the recovery period.

Chronic intranasal action of nitroxoline in the concentration range 15 mg/m³ - 45 mg/m³ had a pronounced dysbiotic effect. Compared with the background indicators, there was a 3-fold decrease in the frequency of detection of bifidobacteria, the displacement of gram-positive cocci and gram-negative rods from the ecotope, in 37,5 % of animals the presence of mycelial fungal colonization was revealed. During the rehabilitation period, the structure of the microcenosis of the urogenital tract was not completely restored.

The concentration of nitroxoline 5 mg/m³ with prolonged inhalation action is the threshold for the dysbiotic effect, and 15 mg/m³ is the threshold for this effect.

Key words: nitroxoline, chronic inhalation effect, microbiocenosis, urogenital tract.

Яськів Г.І. ORCID : 0000-00027910-3525

Платонова Ірина Львівна ORCID : 0000-0003-3171-5706, +38097-86-95-614,
Platonova_IL@ukr.net

Альохіна Т.А. ORCID: 0000-0002-0660-8485