



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **147018**

(13) **U**

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 04961	(72) Винахідник(и): Лазаренко Людмила Миколаївна (UA), Бабенко Лідія Павлівна (UA), Співак Микола Якович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.08.2020	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 08.04.2021	(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛотноГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Академіка Заболотного, 154, м. Київ, 03143 (UA)
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 07.04.2021, Бюл.№ 14	

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ВАГІНІТУ У МИШЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання вагініту включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (мишах) із введенням у піхву умовно-патогенних бактерій. При моделюванні використовують штам *Staphylococcus aureus* із плазмідною стійкістю до антибіотика. Встановлюють зв'язок між конкретним причинним фактором та механізмами розвитку, перебігу і завершення патологічного процесу, які визначають за динамічною зміною якісного і кількісного складу піхвової мікробіоти, морфологічної структури стінки піхви, а також показників запальної реакції та імунного статусу на локальному і системному рівнях.

UA 147018 U

UA 147018 U

Корисна модель належить до експериментальної біології і стосується моделювання вагініту в лабораторних тварин; модель може бути використана для доклінічного дослідження антимікробних, протизапальних та імуномодулювальних властивостей лікарських засобів, дієтичних добавок, препаратів медичного призначення тощо.

Відомо, що мікробіота піхви виконує широкий спектр захисних, метаболічних, регуляторних та імунологічних функцій, тому не лише підтримує здоров'я жінок, а й визначає формування мікроекологічного здоров'я новонароджених та людської популяції в цілому. Піхвовий мікробіом - це складна збалансована екосистема, створена на основі взаємодії між мікроорганізмами цього біотопу та слизовою оболонкою піхви, на склад та властивості якої впливає багато факторів ендogenous та екзогенного характеру: місцевий лімфо- та кровообіг; особливості нейроімуноендокринної взаємодії на локальному рівні; мікробіота інших біотопів, лікування антибіотиками (місцеве або системне), гормонами, цитостатиками; використання контрацептивів; стан системи імунітету тощо (Широбоков с соавт., 2010; Medina-Colorado et al., 2017). За фізіологічної норми мікробіота піхви представлена в основному *Lactobacillus* spp., з якими пов'язують формування стану колонізаційної резистентності піхвового біотопу, що запобігає надмірному розмноженню умовно-патогенних мікроорганізмів, а також її заселенню патогенними мікроорганізмами (Sarah Cribby et al., 2008; Watters et al., 2016; Kovachev, 2017, Witkin, Linhares, 2017). Кількість лактобацил (ЛАБ) у піхві здорових жінок становить 10^5 - 10^7 КУО/мл (колонієутворювальних одиниць в 1 мл), а умовно-патогенних мікроорганізмів (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli* тощо) - не повинна перевищувати 10^4 КУО/мл (Бойко, 2012).

Дисбіотичні порушення піхвової мікробіоти, які виникають внаслідок зниження кількості ЛАБ або втрати ними біологічних властивостей (Sarah Cribby, 2008; Stapleton, 2016) на тлі зміни кількості умовно-патогенних мікроорганізмів лежать в основі розвитку інфекційних захворювань у піхві і сечостатевої системі, а також підвищують сприйнятливість до захворювань, що передаються статевим шляхом (Stapleton, 2016; Gupta et al., 2017). З різним ступенем дисбіотичних порушень у піхві, який визначається зміною видового складу мікроорганізмів та їх вірулентністю, кількісним рівнем кожного виду і станом імунної системи, пов'язують різноманітні клінічні прояви і симптоми інфекційно-запальних захворювань сечостатевої системи, а також їх часті рецидиви. У розвиток дисбіозу піхви залучається широкий спектр умовно-патогенних аеробних (*Staphylococcus aureus*, коагулазонегативні стафілококи (*S. saprophiticus* і *S. epidermidis*), *E. coli*, стрептококи групи В (*S. agalactiae*), *Enterococcus faecalis* тощо) і анаеробних (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp. тощо) мікроорганізмів, а також гриби роду *Candida*. З піхвовим дисбіозом пов'язують виникнення вагініту, вагінозу або вагінального кандидозу (Donders et al., 2001; Donders et al., 2002; Donders et al., 2008; Гопчук, Морозова, 2015; Никітіна, 2017; Sherrard et al., 2018).

Вагініт (запалення піхви) - найпоширеніше інфекційне захворювання піхви, спричинене аеробними патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами, переважно *S. aureus*, *E. coli* та стрептококами групи В, частота якого зростає у всьому світі (Гопчук, Морозова, 2015; Никітіна, 2017). Перебіг вагініту супроводжується підвищенням рН піхви, гнійними виділеннями та деяким ступенем атрофії і запалення на тлі зменшення кількості ЛАБ та збільшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів (Sherrard et al., 2018). У хворих на вагініт часто виявляють змішані інфекції, а в зішкребах зі слизової оболонки піхви - велику кількість лейкоцитів, епітеліальних клітин та функціонально активних макрофагів (Гопчук, Морозова, 2015). На основі результатів клінічних, мікробіологічних та імунологічних досліджень нещодавно було запропоновано виокремити як окрему гінекологічну патологію "аеробний вагініт" - інфекційно-запальне захворювання піхви, індуковане виключно аеробними умовно-патогенними мікроорганізмами, які мають кишкове походження і колонізують піхву. "Аеробний вагініт" відрізняється від бактеріального вагінозу і специфічного вагініту та частіше від них залучається у розвиток різних акушерських ускладнень. Його характерною особливістю є гіперемія слизової оболонки піхви, виділення жовтого кольору, свербіж, а також розвиток вираженої імунної відповіді і запальної реакції, підтверджених високою концентрацією прозапальних цитокінів (Donders et al., 2001; Donders et al., 2002; Donders et al., 2008). Етапність лікування вагініту та інших інфекцій у піхві включає етіотропну терапію та відновлення її мікробіоти (Sherrard et al., 2018). Тому дослідження піхвової мікробіоти має важливе значення не лише для вивчення їх патогенезу, а й для оптимізації методів профілактики та лікування хворих.

У зв'язку з вищенаведеним існує значний інтерес до використання експериментальних моделей інфекцій у піхві, на яких можливо відтворити патологічний процес, індукований кожним конкретним або одночасно різними мікроорганізмами (мікст-інфекції). Зокрема, доцільність використання експериментальних мишиних моделей для встановлення закономірностей

розвитку, індивідуальних форм перебігу і завершення інфекцій у піхві, а також ефективності етіотропної і патогенетичної терапії вже є доведеною для багатьох уропатогенів, зокрема стрептококів групи B (De Gregorio et al., 2015; Vrbanc et al., 2018), *C. albicans* (Rahman et al., 2010; Yano, Fidel, 2011), *G. vaginalis* (Sierra et al., 2018) *Chlamydia trachomatis* (Su et al., 1995), *Trichomonas vaginalis* (Meysick, Garber, 1992) та *S. aureus* (Zarate et al., 2007; Воронкова с соавт., 2008).

Найближчим аналогом корисної моделі є модель вагінальної інфекції у мишей лінії BALB/c, індукована уропатогенним штамом *S. aureus*, за якої виявлено локальне запалення і зміну морфологічної структури стінки піхви (Zarate et al., 2007).

Задачею корисною моделі є створення експериментальної моделі вагініту, що включає введення в піхву мишей лінії BALB/c умовно-патогенних бактерій *S. aureus* із плазмідною стійкістю до антибіотика. За цієї моделі встановлюють зв'язок між конкретним причинним фактором та механізмами розвитку, перебігу і завершення патологічного процесу, підтвердженими візуальними клінічними ознаками захворювання, видовою та кількісною зміною піхвової мікробіоти, а також динамічним порушенням морфологічної структури стінки піхви, показників запальної реакції та імунного статусу на локальному і системному рівнях. Запропонована експериментальна модель може бути використана для визначення патогенезу інфекційно-запальних захворювань сечостатевої системи, а також для проведення доклінічних досліджень антимікробних, протизапальних та імуномодуючих властивостей лікарських засобів, дієтичних добавок, препаратів медичного призначення тощо. Запропонована експериментальна модель надає можливість визначити чіткіший зв'язок між конкретним умовно-патогенним штамом *S. aureus*, який завдяки наявності плазмиди стійкості до антибіотика може бути відділений від інших штамів стафілококів шляхом культивування на елективних поживних середовищах з цим антибіотиком, та ширшим спектром клінічних проявів вагініту.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі моделювання вагініту, що включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (мишах) із введенням у піхву умовно-патогенних бактерій, згідно з корисною моделлю, при моделюванні використовують штам *Staphylococcus aureus* із плазмідною стійкістю до антибіотика, встановлюють зв'язок між конкретним причинним фактором та механізмами розвитку, перебігу і завершення патологічного процесу, які визначають за динамічною зміною якісного і кількісного складу піхвової мікробіоти, морфологічної структури стінки піхви, а також показників запальної реакції та імунного статусу на локальному і системному рівнях.

Спосіб пояснюється кресленнями.

На фіг. 1 показана морфологічна структура стінки піхви інтактних мишей. Слизова оболонка складається з двошарового плоского епітелію. Визначають характерну естроген-обумовлену вакуолізацію епітеліоцитів. Просвіт піхви містить поодинокі десквамовані епітеліоцити. Поліморфноядерні лейкоцити в стінці і в просвіті піхви не виявляються. Забарвлення гематоксиліном та еозином. X 40.

На фіг. 2 показана морфологічна структура стінки піхви інфікованих стафілококом мишей на 2 добу експерименту. Слизова оболонка набрякла, складається з багатошарового плоского епітелію з ороговінням поверхневих шарів. У просвіті піхви - скупчення десквамованих клітин і слизу, інфільтрованого поліморфноядерними лейкоцитами (фото зліва). Виявляють поодинокі лімфоїдні елементи, що мігрують в епітеліальний пласт (фото справа). Забарвлення гематоксиліном та еозином. X 40.

На фіг. 3 показана морфологічна структура стінки піхви інфікованих стафілококом мишей на 4 добу експерименту. Плоский епітелій слизової оболонки потовщений, відмічається проліферація базального шару і наявність кератинового шару. У просвіті піхви виявляють десквамовані кератиноцити, зроговілі фрагменти, поодинокі лейкоцити та їх скупчення (фото зліва). Поліморфноядерні лейкоцити, які скупчуються в субепітеліальних ділянках, інфільтрують багатошаровий епітелій і проникають у просвіт піхви (фото справа). Забарвлення гематоксиліном та еозином. X 40.

На фіг. 4 показана морфологічна структура стінки піхви інфікованих стафілококом мишей на 7 добу експерименту. Плоский епітелій слизової оболонки потовщений, відмічається проліферація базального шару і наявність кератинового шару. Просвіт піхви містить десквамовані кератиноцити, зроговілі фрагменти та невеликі скупчення лейкоцитів (фото зліва). Епітеліальний шар набряклий, спостерігається його вогнищева інфільтрація лімфоїдними клітинами, скупчення яких виявляються також в субепітеліальних ділянках (фото справа). Забарвлення гематоксиліном та еозином. X 40.

На фіг. 5 показана морфологічна структура стінки піхви інфікованих стафілококом мишей на 10 добу експерименту. Слизова оболонка складається з потовщеного набряклого

багатошарового плоского епітелію; виявляється чітко сформований кератиновий шар (фото зліва). У просвіті піхви - десквामовані кератинові пластинки, злущений епітелій, невелика кількість поліморфноядерних лейкоцитів. Спостерігається вогнищева інфільтрація поверхневих ділянок епітеліального шару поліморфноядерними лейкоцитами (фото справа). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Х 40.

Спосіб здійснюють наступним чином. У піхву імунodefіцитних мишей лінії BALB/c вводять суспензію добової культури *S. aureus* штам 8325-4, який містить плазмиду стійкості до гентаміцину. Використовують шеститижневих самиць мишей лінії BALB/c, вагою 16-18 г, синхронізованих за естральним циклом. Тварин утримують в стандартних умовах віварію у пластикових клітках в окремому приміщенні при сталій температурі повітря (22-25 °C); вони отримують повноцінне харчування та мають вільний доступ до автопоїлок. Мишей витримують на карантині протягом двох тижнів. Перед моделювання вагініту штам *S. aureus* 8325-4 вирощують на поживному елективному середовищі для стафілококів (наприклад BAIRD-PARKER-Agar, Merck, Німеччина) із гентаміцином (15 мг/мл) при 37 °C протягом 18 год. Після цього його тричі відмивають у 0,15 М розчині NaCl шляхом центрифугування при 7 тис. об/хв і готують суспензію в 0,15 М розчині NaCl із концентрацією 2×10^8 кл/мл за допомогою оптичного стандарту каламутності Державного інституту стандартизації і контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.А. Тарасевича. Для відтворення бактеріального вагініту в піхву мишей (не менше 6 тварин у групі) одноразово вводять 25 мкл суспензії штаму *S. aureus* 8325-4 у 0,15 М розчині NaCl за допомогою піпеткового дозатора. Мишам контрольної групи аналогічним чином вводять 25 мкл 0,15 М розчину NaCl.

Починаючи з 1 доби після інфікування, у мишей спостерігають набряк і гіперемію вульви, збільшення кількості слизових виділень білувато-жовтого кольору із піхви та зміну поведінкових реакцій - вони стають млявими, погано поїдають харчові раціони тощо. Результати загальноприйнятих мікробіологічних методів дослідження піхвових виділень, наведені в табл. 1, показали, що в інтактних мишей домінують бактерії різних родів грам-позитивних факультативних анаеробів: на елективні поживні середовища висіваються аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми (м'ясо-пептонний агар (МПА)), зокрема стафілококи (BAIRD-PARKER-Agar, Himedia, Індія), стрептококи (KF-STREPTOCOCCUS-A, Himedia, Індія), ентеробактерії (ЕНДО, Himedia, Індія), ЛАБ (De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA), Merck, Німеччина), біфідобактерії (Bifidobacterium Agar (BA), Himedia, Індія), а також мікроскопічні гриби (САБУРО, Himedia, Індія) (табл. 1). Із піхви інфікованих мишей протягом усього терміну спостереження (на 2-13 добу) у сталій великій кількості висівають *S. aureus* 8325-4 на поживне елективне середовище для стафілококів із гентаміцином (BAIRD-PARKER-Agar, Himedia, Індія), що супроводжується зміною піхвової мікробіоти. У піхві інфікованих мишей зменшується кількість ЛАБ та біфідобактерій на тлі суттєвого підвищення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів - аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів, зокрема стрептококів, стафілококів, коліморфних бактерій та мікроскопічних грибів порівняно з інтактними мишами. *S. aureus* 8325-4 виявляють також у нирках (на 4-13 добу) та кишковому вмісті (на 2-13 добу) інфікованих мишей, що свідчить про його транслокацію із піхви в інші біотопи (табл. 1). У нирках інфікованих мишей з'являються стрептококи (на 7-13 добу), коліморфні бактерії (на 4-10 добу), грибна флора (на 7-13 добу) та стафілококи, що може спричинити розвиток пієлонефриту. У кишечнику інфікованих мишей виявляють дисбіотичні порушення: у різні терміни спостереження в кишковому вмісті зменшується кількість ЛАБ, біфідо- та коліморфних бактерій, але збільшується кількість стафілококів та грибної флори. Підвищення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів у кишечнику, як відомо (Reid, Bruce, 2006), також може бути причиною виникнення вагінозу та інфекцій сечостатевої системи, оскільки вони можуть підніматись вздовж промежини до піхви, а потім до сечовипускального каналу та сечового міхура.

Зміну видового складу мікробіоти піхви мишей, інфікованих *S. aureus* 8325-4, підтверджено результатами MALDI-TOF мас-спектрометрії. В піхві інтактних мишей стафілококи представлено переважно видами *S. aureus* (10^3 - 10^7 КУО/мл), *S. nepalensis* (10^4 - 10^6 КУО/мл) та *S. cohnii* (10^5 - 10^7 КУО/мл); стрептококи - *S. agalactiae* (10 КУО/мл); ентеробактерії - *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Morganella (Proteus) morganii* (10^1 - 10^{10} КУО/мл); ЛАБ - *L. reuteri* та *L. acidophilus* (10^5 - 10^8 КУО/мл). У піхві деяких інтактних мишей виявляють *Pseudomonas aeruginosa* (10^3 - 10^8 КУО/мл) та мікроскопічні гриби роду *Candida* spp. (10^3 - 10^6 КУО/мл).

Після інфікування мишей *S. aureus* 8325-4 відбувається порушення видового складу піхвової мікробіоти, характерне для розвитку вагініту. Із піхви інфікованих мишей висівають ентеробактерії - *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*; кокові форми мікроорганізмів - *S. aureus*, *S. agalactiae*, а також *P. aeruginosa*, *E. faecalis* та мікроскопічні гриби роду *Candida* spp. ЛАБ

представлені лише видом *L. acidophilus*, який висівають у кількості 10^2 - 10^5 КУО/мл протягом усього терміну спостереження (2-13 доба). Натомість кількість стафілококів збільшується до 10^6 - 10^8 КУО/мл на 2-13 добу спостереження. Кількість *S. agalactiae* на 2 та 4 добу не змінюється порівняно з інтактними мишами (10^4 - 10^5 КУО/мл), але в подальші терміни спостереження підвищується до 10^7 КУО/мл. У піхві інфікованих мишей виявляють *P. aeruginosa* у кількості 10^7 - 10^8 КУО /мл. У невеликій кількості із піхви окремих інфікованих мишей висівають мікроскопічні гриби роду *Candida* spp. (10^1 - 10^3 КУО/мл), *E. faecalis* (10^1 - 10^3 КУО/мл), а також *E. coli*, *P. mirabilis* і *K. pneumoniae* (10^9 - 10^{10} КУО/мл). Тобто, в піхві мишей, інфікованих *S. aureus* 8325-4, до мінімального рівня зменшується кількість ЛАБ та підвищується кількість *S. aureus*, *S. agalactiae* і *P. aeruginosa* протягом усього терміну спостереження.

Таблиця 1

Спектр мікробіоти піхви, нирок та кишкового вмісту інфікованих мишей, М±m

Групи тварин	Доба	Кількість мікроорганізмів, що висівались на поживних середовищах, LgКУО/мл							
		МПА	BAIRD-PARKER-Agar	BAIRD-PARKER-Agar з гентаміцином	KF-Streptococcus agar	MRSA	BA	ЕНДО	Сабуро
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Піхва									
Інтактні миші	-	2,24±0,12	2,51±0,08	0	2,08±0,04	2,68±0,03	2,46±0,04	1,08±0,05	2,07±0,04
Інфіковані миші	2	3,78±0,13*	4,54±0,08*	3,61±0,02*	3,53±0,05*	2,79±0,13	2,22±0,06*	1,60±0,04*	2,63±0,05*
	4	3,82±0,09*	4,30±0,05*	3,22±0,01*	3,45±0,03*	2,63±0,04	2,11±0,03*	1,48±0,04*	1,48±0,02*
	7	3,83±0,11*	4,25±0,07*	3,25±0,04*	3,34±0,07*	2,00±0,01*	1,76±0,02*	1,48±0,06*	2,18±0,08
	10	3,51±0,08*	4,22±0,11*	3,28±0,02*	3,26±0,11*	2,23±0,02*	2,02±0,02*	1,30±0,00*	2,34±0,05*
	13	3,36±0,08*	4,19±0,09*	3,48±0,03*	3,22±0,08*	2,32±0,03*	1,48±0,05*	1,48±0,04*	1,90±0,02
Нирки									
Інтактні миші	-	1,20±0,01	1,00±0,01	-	0	0	0	0	0
Інфіковані миші	2	1,60±0,02*	1,47±0,03*	0	0	0	0	1,15±0,01*	0
	4	1,85±0,04*	1,86±0,04*	1,35±0,02	0	0	0	0	0
	7	2,35±0,06*	2,00±0,07*	1,48±0,01	1,15±0,01*	0	0	0	1,28±0,02*
	10	2,10±0,03*	1,55±0,02*	1,15±0,01	1,65±0,03*	0	0	1,34±0,02*	1,30±0,02*
	13	2,31±0,02*	1,69±0,02*	1,35±0,03	2,10±0,05*	0	0	0	1,15±0,01*
Кишковий вміст									
Інтактні миші	-	4,75±0,08	2,87±0,04	-	3,25±0,05	2,68±0,02	2,15±0,02	4,15±0,09	2,77±0,05
Інфіковані миші	2	4,65±0,06	3,98±0,06*	1,45±0,01*	3,12±0,06	2,11±0,01*	2,11±0,04	4,11±0,07	2,98±0,04*
	4	4,32±0,04*	3,65±0,08*	2,78±0,03*	3,05±0,07	1,56±0,01*	2,15±0,03	3,64±0,07*	3,11±0,06*
	7	4,98±0,07	3,78±0,11*	2,95±0,02*	2,96±0,02*	1,68±0,01*	1,92±0,01*	3,38±0,08*	3,14±0,08*
	10	4,13±0,05*	3,42±0,06*	2,53±0,03*	3,09±0,05	1,82±0,02*	1,65±0,01*	3,43±0,02*	2,76±0,08
	13	4,25±0,10*	3,56±0,08*	2,40±0,04*	3,13±0,04	1,94±0,03*	1,68±0,02*	3,58±0,03*	3,04±0,06*

Примітка. * - Різниця вірогідна відносно показників для інтактних мишей (p < 0,05)

Про розвиток вагітності в мишей, інфікованих *S. aureus* 8325-4, свідчить динамічна зміна морфологічної структури стінки піхви (фіг. 1).

Незначна морфологічна зміна стінки піхви - набряк епітелію та інфільтрація епітеліального пласта лімфоїдними клітинами, спостерігаються вже на 2 (фіг. 2) та 4 (фіг. 3) добу після інфікування. На 2 добу експерименту слизова оболонка піхви інфікованих мишей набрякла та складається з багат шарового плоского епітелію з ороговінням поверхневих шарів. У просвіті піхви виявляють скупчення десквामованих клітин і слизу, інфільтрованого поліморфноядерними лейкоцитами. Рогові пластинки відшаровуються від епітеліального пласта. Епітеліоцити мають ознаки внутрішньоклітинного набряку, що може бути наслідком розвитку інфекційно-запального процесу. Виявляють поодинокі лімфоїдні елементи, які мігрують в епітеліальний пласт. У підслизовому шарі спостерігають повнокрів'я кровоносних судин, а також інтерстиціальний набряк. На 4 добу експерименту ознаки інфекційно-запального процесу в піхві інфікованих мишей більш виражені, ніж на 2 добу. Плоский епітелій слизової оболонки піхви потовщується, відмічають проліферацію базального шару і наявність кератинового шару. Просвіт піхви містить десквामовані кератиноцити, зроговілі фрагменти, поодинокі лейкоцити та їх скупчення. Спостерігають набряк епітеліального пласта та ознаки порушення утворення кератину; цілі ділянки епітеліального пласта не мають кератинового шару. В субепітеліальних ділянках є скупчення поліморфноядерних лейкоцитів, які інфільтрують багат шаровий епітелій і проникають у просвіт піхви. В субепітеліальній сполучній тканині визначають повнокрів'я судин,

ознаки помірного набряку, а також легку інфільтрацію поліморфноядерними лейкоцитами. Зміна гістологічної структури стінки піхви інфікованих мишей суттєвіша на 7 добу експерименту (фіг. 4) і проявляється вираженими процесами набрякання епітеліального пласта, його вогневищевою інфільтрацією лімфоїдними клітинами та поліморфноядерними лейкоцитами, скупчення яких є також в субепітеліальних ділянках. Виявляють помірно виражену інфільтрацію запальними клітинами підслизового шару, м'язової і навіть адвентиційної оболонки стінки піхви, серед яких переважають лімфоїдні елементи. Плоский епітелій слизової оболонки піхви потовщений; відмічають проліферацію базального шару і наявність кератинового шару. Просвіт піхви містить десквамовані кератиноцити, зроговілі фрагменти, невеликі скупчення лейкоцитів. На 10 добу експерименту (фіг. 5) інфекційно-запальний процес має тенденцію до загасання - стінка піхви складається з потовщеного набряклого багат шарового плоского епітелію; виявляють чітко сформований кератиновий шар. У просвіті піхви є десквамовані кератинові пластинки, злущений без'ядерний епітелій, невелика кількість поліморфноядерних лейкоцитів. Вогнищево спостерігають інфільтрацію поверхневих ділянок епітеліального пласта поліморфноядерними лейкоцитами. У власній пластинці відмічають набряк, повнокрів'я судин мікроциркуляторного русла, а також легку змішану клітинну запальну інфільтрацію.

Водночас внаслідок розвитку локальної імунної відповіді до стафілококу в слизовому та підслизовому шарі стінки піхви інфікованих мишей, її епітеліальній вистелці та просвіті динамічно змінюється кількість клітин, які експресують Толл-подібні рецептори (TLR) 2, 4 та 9 типу. На 2 добу експерименту виявляють помірну експресію TLR2 в клітинах усього шару епітелію слизової оболонки піхви і в ендотелії кровоносних судин, але інтенсивну в помірній кількості збільшених в розмірах макрофагах підслизового шару та в макрофагах, що мігрують у просвіт піхви. Експресії TLR4 є помірною в клітинах всього шару епітелію слизової оболонки піхви і в ендотелії кровоносних судин. У макрофагах підслизового шару і в макрофагах, що мігрують в просвіт піхви, експресія TLR4 та TLR9 виражена. TLR9 позитивні макрофаги є також і на поверхні слизової оболонки піхви. На 4 та 7 добу експерименту виявляють значну кількість TLR2-, TLR4 та TLR9- позитивних макрофагів у підслизовому шарі, епітеліальному пласті і, особливо, на поверхні слизової оболонки, де ці клітини утворюють суцільний пласт. У просвіті піхви - велика кількість дистрофічно зміненого і десквамованого епітелію, інфільтрованого макрофагами. Епітеліальна висилка набрякла, інфільтрована макрофагами і мікроорганізмами. Визначають значний набряк підслизового шару. На 10 добу експерименту в підслизовому шарі піхви інфікованих мишей виявляють незначну кількість макрофагів, які експресують TLR2, TLR4 та TLR9. Інфільтрація епітеліального пласта макрофагами та реакція в дендритних клітинах епітеліальної висилки відсутні. На поверхні епітеліальної висилки піхви запальних клітин немає. В просвіті піхви виявляють злущений плоский епітелій у значній кількості та поодинокі макрофаги. Отже, зменшення кількості *S. aureus* 8325-4 у піхві (табл. 1) супроводжується поступовим загасанням морфологічних ознак локального запалення на тлі зменшення кількості TLR2-, TLR4-та TLR9-позитивних макрофагів у підслизовому шарі, епітеліальному пласті, і особливо на поверхні її слизової оболонки.

Інфікування мишей *S. aureus* 8325-4 призводить до розвитку імунної відповіді та запального процесу також на системному рівні. В інфікованих мишей відбувається зміна морфологічної структури селезінки, характерна для розвитку гіперплазії лімфоїдної тканини як прояву запальної відповіді організму. Ознаки гіперплазії лімфоїдної тканини селезінки, які виявляють на 4 добу експерименту, прогресують впродовж наступного терміну спостереження - на 7 та 10 добу. На 4, 7 та 10 добу експерименту в селезінці інфікованих мишей межа між білою та червоною пульпою зникає, а в зародкових центрах фолікулів збільшується кількість центроцитів і центробластів порівняно з інтактними мишами. Підвищення кількості макрофагів та нейтрофілів у червоній пульпі селезінки інфікованих мишей, починаючи вже з 2 доби експерименту та на 4, 7, 9 добу, вказує на активну імунну відповідь до стафілококу. Кількість CD3+, CD4+, CD8+ Т-лімфоцитів у селезінці інфікованих мишей, які визначають за допомогою методу протокової цитофлуориметрії з використання моноклональних антитіл до цих CD антигенів, не змінюється на 2 добу експерименту (табл. 2). Однак на 4 добу показники клітинної ланки імунітету порушуються: кількість CD3+, CD4+ Т-лімфоцитів, а також імунорегуляторний індекс CD4/CD8 зменшуються, хоч на рівні контролю зберігається кількість CD8+ Т-лімфоцитів. На 7 та 10 добу кількість CD3+, CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитів у селезінці інфікованих мишей та імунорегуляторний індекс CD4/CD8 не змінюються порівняно з показниками для інтактних мишей. На 4 та 7 добу в селезінці інфікованих мишей зменшується кількість природних кілерних клітин (ПКК). Гуморальна імунна відповідь активується на 7 добу експерименту: у селезінці інфікованих мишей майже удвічі зростає кількість CD 19+ В-лімфоцитів, із поступовим затуханням на 10 добу.

Таблиця 2

Кількість Т-, В-лімфоцитів у селезінці інфікованих стафілококом мишей

Групи мишей/термін спостереження, доба		Відносна кількість клітин, %				CD4/CD8, ум. од.
		CD3+	CD4+	CD8+	CD 19+	
Інтактні	-	61,9±2,5	38,6±1,3	26,3±4,9	7,1±0,5	1,5±0,1
Інфіковані	2 доба	63,8±1,3	38,6±0,4	22,8±0,1	6,7±0,1	1,7±0,1
	4 доба	53,3±0,7 *	29,5±0,5 *	27,1±0,5	10,5±1,7	1,0±0,1*
	7 доба	56,3±3,2	37,5±0,7	23,6±2,3	15,3±1,6*	1,6±0,1
	10 доба	56,6±8,5	36,9±2,5	24,1±2,2:	9,6±2,7	1,5±0,1

Примітка. * - Різниця вірогідна відносно показників для інтактних мишей (p < 0,05)

В інфікованих мишей змінюються функціональні макрофаги перитонеального ексудату (МФПЕ), найважливіші елементи вродженого імунітету, що залучаються у захист від стафілококової інфекції та відіграють ключову роль в індуктивній фазі імунної відповіді. Впродовж усього терміну спостереження (2-10 доба) із МФПЕ висівається *S. aureus* 8325-4 у сталій кількості та виявляють порушення їх поглинальної активності за фагоцитарним числом (середньою кількістю латексу, що поглинався одним фагоцитом), що може сприяти хронізації та рецидивуванню інфекційного процесу. Однак підвищується кількість МФПЕ, які продукують активні метаболіти кисню (у тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест)), що, як відомо (Дранник, 2010), може запускати каскад вільнорадикальних перетворень, розвиток реакцій ліпопероксидації та мати наслідком пошкодження тканин і клітин. В інфікованих мишей різниця між показниками спонтанного та стимульованого НСТ-тесту невірогідна, що вказує на зниження резервних можливостей МФПЕ та імунітету взагалі. Також зменшується їх цитокінсинтезувальна здатність - рівень продукції інтерлейкіну(ІЛ)-12 значно нижчий в культурі МФПЕ інфікованих мишей, ніж в інтактних мишей.

У сироватці крові інфікованих мишей змінюється рівень про- та протизапальних цитокінів - фактора некрозу пухлин- α (ФНП), інтерферону- γ (ІФН- γ), ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 та ІЛ-12, які впливають на функціональну активність клітин фагоцитарної системи, розвиток запалення, а також балансують імунну відповідь Th1- та Th2-типу за імунорегуляторної та ефекторної стадій розвитку (табл. 3). Після інфікування мишей *S. aureus* 8325-4 на 4 добу експерименту рівень прозапального цитокіну - ФНП α збільшується, а протизапального цитокіну - ІЛ-10 - зменшується. Натомість на 2-4 добу у сироватці крові зменшується рівень ІЛ-12, який сприяє диференціюванню "наївних" Т-хелперів (Th0-типу) в хелпери Th1-типу, а також посилює генерацію ПКК та цитотоксичних Т-лімфоцитів (Дранник, 2010). В інфікованих мишей виявляють знижений рівень сироваткових ІФН- γ (на 4 добу) і ІЛ-2 (на 2-4 добу), основними клітинами продуцентами яких є Т-хелпери Th1-типу, також підвищений рівень цитокіну Th2-типу - ІЛ-4, що може призводити до переважного розвитку Т-хелперів Th2-типу, а, отже, до пригнічення клітинної ланки імунітету. Підвищення рівня ІЛ-6 у сироватці крові інфікованих мишей на 7 та 10 добу може сприяти утворенню специфічних антитіл за ефекторної стадії розвитку імунної відповіді та затуханню запальної реакції на кінець експерименту.

Отже, введення *S. aureus* 8325-4 у піхву мишей лінії BALB/c призводить до розвитку вагініту, підтвердженого видовою і кількісною зміною піхвової мікробіоти та динамічним порушенням морфологічної структури стінки піхви, характерним для розвитку інфекційно-запального процесу. *S. aureus* 8325-4 висівається із піхви, нирок і кишкового вмісту інфікованих мишей та викликає запальну реакцію у піхві та селезінці, а також розвиток локальної і системної імунної відповіді. Про зміну локальної імунної відповіді свідчить інфільтрація поліморфноядерними лейкоцитами епітеліального пласта, підслизового шару, м'язової і адвентиційної оболонки стінки піхви, а також суттєве підвищення експресії TLR2, TLR4 та TLR9 на імунних клітинах слизового і підслизового шару стінки, епітеліальної вистелки та просвіту піхви. На системному рівні розвиток імунної відповіді підтверджується підвищенням кількості макрофагів та нейтрофілів у червоній пульпі селезінки інфікованих мишей. Перебіг індукованого *S. aureus* 8325-4 вагініту у мишей супроводжується характерною для бактеріальної інфекції зміною показників імунного статусу на системному рівні: порушується функціональна активність МФПЕ та показники клітинної ланки імунітету на тлі зниження продукції цитокінів Th1-типу (ІЛ-2, ІЛ-12, ІФН- γ) і підвищення продукції цитокінів Th2-типу (ІЛ-4), а також активації розвитку гуморальної імунної відповіді на кінець експерименту.

Рівень цитокінів у сироватці крові інфікованих стафілококом мишей

Групи мишей/ термін спостереження, доба		Концентрація цитокінів, пкг/мл						
		ФНП α	ІЛ-6	ІЛ-12	ІФН- γ	ІЛ-2	ІЛ-4	ІЛ-10
Інтактні	-	29,2 \pm 2,8	23,0 \pm 6,0	2585,5 \pm 103,2	9,0 \pm 1,0	3,3 \pm 0,1	3,1 \pm 0,9	54,7 \pm 5,2
Інфіковані	2	16,6 \pm 6,0	16,9 \pm 2,0	1994,7 \pm 98,2*	4,3 \pm 0,7*	1,1 \pm 0,2*	4,7 \pm 1,1	51,7 \pm 1,2
	4	39,1 \pm 2,2*	16,6 \pm 5,1	1373,7 \pm 99,0*	8,7 \pm 2,4	0,4 \pm 0,1*	8,7 \pm 0,7*	27,9 \pm 1,1*
	7	37,4 \pm 3,7	36,0 \pm 2,1*	2493,3 \pm 145,2	7,4 \pm 1,9	4,5 \pm 1,2	9,1 \pm 2,9*	50,3 \pm 7,5
	10	30,0 \pm 4,8	39,1 \pm 2,0*	2703,2 \pm 123,9	5,1 \pm 3,0	2,6 \pm 0,7	16,4 \pm 1,3*	48,4 \pm 4,2

Примітка. * - Різниця вірогідна відносно показників для інтактних мишей (p < 0,05)

Ефективність використання запропонованою моделі вагініту у мишей лінії BALB/c, індукованого *S. aureus* 8325-4, є підтвердженою, зокрема стосовно скринінгу пробіотичних штамів лактобацил, перспективних для розроблення супозиторіїв з пробіотичною активністю для вагінального використання та оральної форми пробіотиків. Пробіотичні штами лактобактерій, які на запропонованій нами моделі вагініту виявили найкращі антимікробні, протизапальні та імуномодулювальні властивості (Патент № 93133; Lazarenko et al., 2012; Патент № 98881, 2015; Babenko et al., 2015), продемонстрували високу лікувальну дію при дисбіозах піхви та вагінітах у хворих жінок, пов'язану з нормалізацією мікробіоти піхви та показників імунного статусу організму (Лазаренко та ін., 2019).

Джерела інформації:

- Широбоков В.П., Янковский Д.С., Дымент Г.С. Микробная экология человека с цветным атласом. Учебное пособие. - К.: ООО "Червона Рута-Тур", 2010. - 340 с.
- Medina-Colorado A.A., Vincent K.L., Miller A.L., Maxwell C.A., Dawson L.N., Olive T., Kozlova E.V., Baum M.M., Pyles R.B. Vaginal ecosystem modeling of growth patterns of anaerobic bacteria in microaerophilic conditions. *Anaerobe*. 2017. - 45. - 10-18.
- Cribby S, Taylor M., Reid G. Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. (2008) 2008:256490. doi: 10.1155/2008/256490.
- Watters C, Fleming D., Bishop D., Rumbaugh K.P. Host responses to biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci*. - 2016. - 142. - 193-239.
- Kovachev S. Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol*. - 2017. - 1-9.
- Witkin S.S., Linhares I.M. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG*. - 2017. - 124(4). - 606-611.
- Бойко Г.Б. Бактеріальний вагіноз: сучасний погляд на проблему Український медичний часопис. - 2012. - 5 (91) - IX/X г. <https://www.urnj.com.ua/article/42714/bakterialnij-vaginoz-suchasnij-poglyad-na-problemu>
- Stapleton A.E. The vaginal microbiota and urinary tract infection. *Microbiol Spectr*. - 2016. - 4(6). - 10.1128/microbiolspec.UTI-0025-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0025-2016...
- Gupta V., Nag D., Garg P. Recurrent urinary tract infections in women: How promising is the use of probiotics? *Indian J Med Microbiol*. - 2017, Jul-Sep. - 35(3). - 347-354. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_16_292.
- Donders G.G., Vereecken A., Bosnians E. Aerobic vaginitis is an entity with abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis. *Int. J. STD AIDS*. - 2001. - 12(2). - 68.
- Donders G.G., Vereecken A., Bosnians E., Dekeersmaecker A., Salembier G., Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG*. - 2002, Jan. - 109(1). - 34-43. doi: 10.1111/j.1471-0528.2002.00432.x.
- Donders G.G., Van Calsteren C, Bellen G. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy or why metronidasole is not a good option in pregnancy. 6th European Conference ESIDOG / Abstract Book. Plen II-2. 2008.
- Нікітіна І.М. Особливості біоценозу та функціональної активності вагінального епітелію при місцевому лікуванні неспецифічного вагініту. Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. - 2017. - № 2. - С.61-66.
- Гопчук О.М., Морозова О.В. Стратегії впливу на вагінальний біоценоз у жінок груп ризику. З турботою про Жінку. - 2015. - 5(62).
- Sherrard J., Wilson J., Donders G., Mendling W., Jensen J.S. European (IUSTI/WHO) International Union Against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) World Health Organisation (WHO)

Guideline on the Management of Vaginal Discharge. Int J STD AIDS. - 2018. - 29(13). - 1258-1272. doi: 10.1177/0956462418785451.

16. De Gregorio P.R., Juarez Tomas M.S., Nader-Macfas M.E. Immunomodulation of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on group B *Streptococcus* vaginal colonization in a murine experimental model. Am J Reprod Immunol. - 2016. - 75(I). - 23-35. doi: 10.1111/aji.12445. Epub. - 2015, Nov 7.

17. Vrbanc A., Riestra A.M., Coady A., Knight R., Nizet V., Patras K.A. The murine vaginal microbiota and its perturbation by the human pathogen group B *Streptococcus*. BMC Microbiol. - 2018. - 26. - 18(1). - 197. doi: 10.1186/s12866-018-1341-2.

18. Rahman D., Mistry M., Thavaraj S., Naglik J.R., Challacombe S.J. Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonisation. Methods Mol Biol. - 2012. - 845. - 527-535. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8_38.

19. Yano J., Fidel P.L. Jr. Protocols for vaginal inoculation and sample collection in the experimental mouse model of *Candida* vaginitis. J Vis Exp. - 2011. - 58. - 3382.

20. Sierra L.-J., Brown A.G., Barila G.O., Anton L., Barnum C.E., Shetye S.S., et al. Colonization of the cervicovaginal space with *Gardnerella vaginalis* leads to local inflammation and cervical remodeling in pregnant mice. PLoS One. - 2018. - 13. - e0191524. doi: 10.1371/journal.pone.0191524.

21. Su H., Parnell M., Caldwell H/D. Protective efficacy of a parenterally administered MOMP-derived synthetic oligopeptide vaccine in a murine model of chlamydia trachomatis genital tract infection: serum neutralizing IgG antibodies do not protect against chlamydial genital tract infection. Vaccine. - 1995. - 13. - 1023-1032. doi: 10.1016/0264-410X(95)00017-U.

22. Meysick K.C., Garber G.E. Interactions between *trichomonas vaginalis* and vaginal flora in a mouse model. JParasitol. - 1992. - 78. - 157-160. doi: 10.2307/3283708.

23. Zarate G., Santos V., Nader-Macias M. Protective Effect of Vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. Infect Dis Obstet Gynecol. (2009) 2009:48358. doi: 10.1155/2007/48358

24. Воронкова О.С., Сирокваша Е.А., Винников А.И. Модель экспериментального вагинального дисбиоза на белых лабораторных мышах. Микроб. журн. - 2008. - 6. - 47-58.

25. Reid G., Bruce A.W. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. World Journal of Urology. - 2006. - 24(I). - 28-32.

26. Патент № 93133 Штам *Lactobacillus casei* 1MB B-7280 - індуктор "пізнього" інтерферону та активатор макрофагів. Співак М.Я., Шинкаренко Л.М., Підгорський В.С., Горчаков В.Ю., Старовойтова С.О., Лазаренко Л.М., Тимошок Н.О., Бюл. № 1, 10.01.2011. - 4 с.

27. Lazarenko L., Babenko L., Sichel L.S., Pidgorskyi V., Mokrozub V., Voronkova O., Spivak M. Antagonistic action of lactobacilli and bifidobacteria in relation to *Staphylococcus aureus* and their influence on the immune response in cases of intravaginal staphylococcosis in mice // Probiotics and Antimicrobial Proteins. - 2012. - 4 (2). - 78-89.

28. Патент України на корисну модель № 98881 *Lactobacillus casei* IMB-7280 - штам для створення пробіотичного препарату із антибактеріальною та імуномодулювальною дією / М.Я. Співак, Л.М. Лазаренко, О.А. Демченко, Л.П. Бабенко, Бюл. № 9, 12.05.2015

29. Babenko L.P., Lazarenko L.M., Demchenko O.A., Konarbaeva Z.K., Spivak M.Ja. Antibacterial activity of *Lactobacillus casei* IMV B-7280 in cases of experimental urogenital staphylococcosis. Biotechnologia Acta. - 2015. - 8(3). - 55-67.

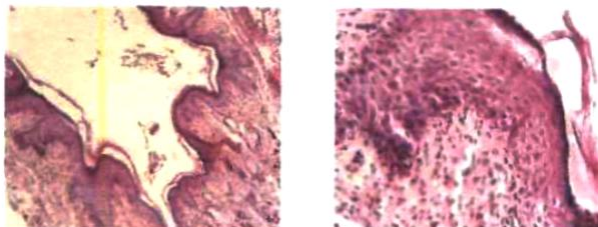
30. Лазаренко Л.М., Михайлишин Г.І., Бабенко Л.П., Климнюк С.І., Полова Ж.М., Глущенко О.М., Співак М.Я. Ефективність супозиторіїв з пробіотичним штамом *Lactobacillus casei* 1MB B-7280 при дисбіозах піхви. Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології: матеріали наукової конференції. - Київ, 5 листопада 2019 р. - С. 90.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання вагініту, що включає проведення експерименту на лабораторних тваринах (мишах) із введенням у піхву умовно-патогенних бактерій, який відрізняється тим, що при моделюванні використовують штам *Staphylococcus aureus* із плазмідною стійкістю до антибіотика, встановлюють зв'язок між конкретним причинним фактором та механізмами розвитку, перебігу і завершення патологічного процесу, які визначають за динамічною зміною якісного і кількісного складу піхвової мікробіоти, морфологічної структури стінки піхви, а також показників запальної реакції та імунного статусу на локальному і системному рівнях.



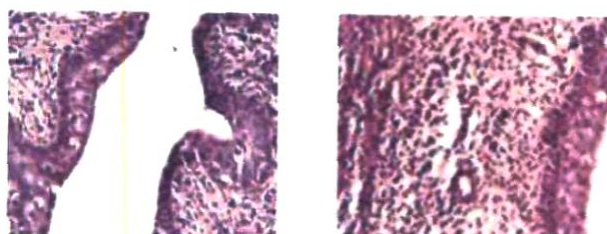
Фіг. 1



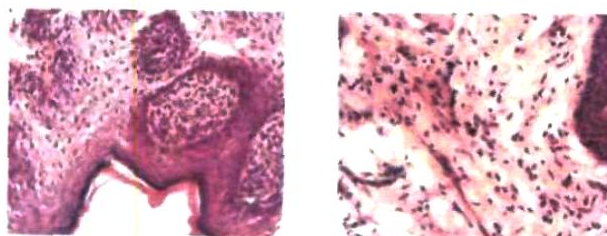
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5