

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ  
ХВОРОБ імені Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО НАМН УКРАЇНИ»**

**БОБИР ВІТАЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ**

УДК:578.835.1:616.34-008.87-008.6

**ЕНТЕРОВІРУСИ В СТРУКТУРІ ДИСБІОТИЧНИХ  
РОЗЛАДІВ**

03.00.06 – вірусологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора медичних наук

**Київ – 2021**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України.

**Науковий консультант** академік НАН та НАМН України, доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України **Широбоков Володимир Павлович**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Дзюблик Ірина Володимирівна**, Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України, завідувачка кафедри вірусології;

доктор медичних наук, професор **Климнюк Сергій Іванович**, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології;

доктор медичних наук, професор **Степанський Дмитро Олександрович**, ДЗ «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології.

Захист відбудеться «16» березня 2021 р. об 11.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.614.01 ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» за адресою: 03038, м. Київ, вул. М. Амосова, 5.

Із дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» (03038, м. Київ, вул. М. Амосова, 5).

Автореферат розісланий «   » \_\_\_\_\_ 2021 р.

**Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат медичних наук**



**Т.Л. Мартинович**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Проблема дисбіотичних розладів залишається однією з найбільш важливих проблем світової медицини і біології, а дані про вплив змін з боку мікробіому на розвиток багатьох захворювань накопичуються стрімкими темпами. Дисбіози надзвичайно поширені серед населення України і потребують адекватної діагностики та корекції з використанням підходів, орієнтованих на новітню світову практику. Останніми роками, у зв'язку із широким застосуванням антибіотиків та зростанням частоти хронічних захворювань органів травлення, проблема порушення складу кишкової мікрофлори набула особливого значення (Tremaroli V., Bäckhed F. 2018; Янковский Д.С., Ширококов В.П., Димент Г.С., 2018). Разом з тим, адекватна корекція дисбіотичних порушень залежить від наукового аналізу факторів і умов, які сприяють формуванню даного стану, а також розробки адекватної біологічної моделі для з'ясування механізмів розвитку дисбіозів. На думку фахівців, профілактика порушення мікробіому, починаючи з молодого віку, є серед найважливіших протекторних заходів з поліпшення якості життя населення (Yatsunenکو T. et al. 2012; Shyrobokov V., Yankovskyi D., Dyment H., 2019).

Однією з особливостей розвитку сучасної медицини є актуалізація вчення про нормальну мікрофлору, яку сьогодні називають «мікробіомом». В наш час для оцінки порушень складу та функції мікробіому використовують термін «дисбіоз», що характеризує в основному зміни серед певних груп симбіотичних мікроорганізмів (бактерій, архей, грибів, найпростіших). Разом з тим, у кишківнику та в інших системах організму виявлено присутність численних вірусних популяцій, що в сукупності складають віром людини (Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., 2007; Virgin H.W., 2014). З'ясування ролі таких вірусних популяцій в функціонуванні організму вимагає глибокого аналізу їх складу і особливостей відносин з іншими представниками мікробіому.

Новітні дослідження «мікробного пейзажу» дозволили віднести до представників вірому і пікорнавіруси, які заселяють біотопи організму людини, в основному шлунково-кишковий тракт, не викликаючи клінічно вираженої патології (Smits L., Osterhaus M.E., 2010). Разом з тим, фізіологічне значення більшості вірусів, які перебувають в організмі здорової людини, залишається не достатньо вивченим. Не виключено, що найближчим часом деякі з вірусів можна буде розглядати з позиції комменсалів. Новітні технологічні підходи, направлені на індикацію вірусів, дають підстави припустити, що наявність вірусів в організмі здорової людини слід розглядати не лише з позиції банального паразитизму.

У світовій літературі є відносно невелика кількість публікацій щодо можливої участі ентеровірусів у розвитку дисбіотичних порушень в кишківнику людини. В наш час висловлюється навіть припущення, що присутність вірусних агентів в організмі здорової людини може бути корисною як для людського організму, так і для його мікрофлори (Cadwell K., 2015).

Про актуальність обраної тематики свідчить і той факт, що сьогодні всебічне вивчення всіх класів мікроорганізмів, в тому числі і вірусів, присутніх в різних

біотопах людини, проводиться в рамках глобального міжнародного проекту (Global Virome Project), який фінансується національними інститутами охорони здоров'я всіх розвинених країн світу та передбачає дослідження біологічної різноманітності вірусів з метою попередження виникнення емерджентних інфекцій (Dennis Carroll et al., 2018). Дослідження кишкового вірому, можливо, дозволить визначити роль його компонентів в підтримці здоров'я організму, а також у розвитку захворювань, особливо у пацієнтів з ослабленим імунітетом, і, очевидно, сприятиме виявленню нових вірусів.

Вивчення проблеми дисбіотичних станів та ролі вірусного фактору у їх структурі є актуальним і важливим як для теоретичної, так і для практичної медицини, і потребує проведення фундаментальних експериментальних досліджень з використанням сучасних підходів та методів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана у відповідності до затверджених МОЗ України тематичних планів наукових досліджень кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Дана наукова робота є фрагментом кафедральної науково-дослідної роботи «Ентеровіруси. Дисоціація: теоретичні аспекти, практичне значення. Циркуляція ентеровірусів у регіонах України. Роль в інфекційній патології людини. Удосконалення методів діагностики та профілактики ентеровірусних інфекцій», державний реєстраційний номер 0102U000200; «Закономірності звільнення стічних вод м. Києва від ентеровірусів на Бортницькій станції аерації», державний реєстраційний номер 0113U000714; «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів», державний реєстраційний номер 0114U001828 (автор – відповідальний виконавець). В роботу також увійшли результати, одержані при виконанні держбюджетної теми «Вивчення особливостей ентеровірусів у хворих з ВІЛ-інфекцією», № держреєстрації 0109U001802 (автор – відповідальний виконавець), та декількох господарсько-договірних тем.

Тему дисертації затверджено на засіданні Вченої ради Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (протокол №7, від 30 травня 2012 р.).

**Мета дослідження** – з'ясувати роль ентеровірусів у розвитку порушень кишкового мікробіому та науково обґрунтувати шляхи корекції складу мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Вивчити закономірності поширення ентеровірусів у різних категорій осіб з дисбіозом кишківника.
2. З'ясувати особливості ізоляції ентеровірусів від осіб з дисбіозом та їх видової ідентифікації, в тому числі і електронно-мікроскопічної верифікації.
3. Дослідити маркери вірулентності та інші біологічні властивості клінічних ізолятів ентеровірусів і встановити їх зв'язок з формуванням дисбіотичних порушень.
4. З'ясувати умови штучного формування порушень з боку мікробіому кишківника у мишей та вивчити можливість моделювання ентеровірусних інфекцій на фоні дисбіотичних станів.

5. Вивчити роль ентеровірусів у формуванні структурно-морфологічних змін кишківника та інших внутрішніх органів при експериментальному дисбіозі і окреслити фактори, які здатні сприяти попередженню розвитку таких порушень.
6. Експериментально обґрунтувати ефективність використання пробіотичних препаратів та сорбентів для профілактики дисбіотичних порушень у мишей з урахуванням вірусного фактору.

**Об'єкт дослідження:** поширеність ентеровірусів у осіб з дисбіотичними порушеннями, їх зв'язок з розвитком дисбіозу кишківника; властивості ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозами; проблема корекції дисбіозу кишківника з урахуванням вірусного фактору.

**Предмет дослідження:** ентеровіруси, виділені від осіб з дисбіозами, фактори, які впливають на частоту індикації ентеровірусів у осіб з дисбіозом кишківника, лабораторні тварини з експериментальним дисбіозом, ультраструктурна картина кишківника тварин при дисбіозах з ентеровірусним компонентом.

**Методи дослідження:** вірусологічні – виділення вірусів у клітинних культурах та лабораторних тваринах; мікробіологічні – визначення мікробіологічних показників стану кишківника; імунологічні – постановка реакції віруснейтралізації; електронно-мікроскопічні та гістологічні – з'ясування патоморфологічних змін кишківника після формування дисбіотичних порушень, а також після інфікування ентеровірусами, молекулярно-генетичні – визначення вірусної нуклеїнової кислоти у клінічному матеріалі; біологічні – моделювання патологічних станів на лабораторних тваринах; статистичні.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше досліджено взаємодію вірому та бактеріального мікробіому кишківника в умовах дисбіозу. Вивчено ступінь інфікованості ентеровірусами осіб з дисбіозом кишківника, в тому числі і осіб з імунодефіцитами, та науково обґрунтовано домінування вакцинних штамів вірусів поліомієліту в загальній структурі ентеровірусів, ізольованих від таких хворих. На підставі вірусологічних та молекулярно-генетичних досліджень фекальних мас здорових осіб і людей з дисбіозом встановлено закономірну присутність в них ентеровірусів. Крім того, експериментально доведено зростання частоти реєстрації вірусів Норфолк в осіб з дисбіозом, а також вперше досліджено присутність коліфагів в зразках фекалій, отриманих від різних категорій осіб, в тому числі і осіб з дисбіотичними порушеннями.

Вивчено генетичні маркери вірулентності ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями (gct<sub>40</sub>, A<sub>бент</sub>, S-маркер) та показано, що ізоляти вірусів поліомієліту, виділених як від здорових осіб, так і від осіб з дисбіозом, мають маркери, характерні для авірулентних штамів, що свідчить про їх вакцинну природу. Разом з тим, встановлено зростання частоти реєстрації позитивних маркерів вірулентності у вірусів Коксакі В та нетипованих штамів ентеровірусів, виділених від осіб з порушеним мікробіоценозом кишківника.

Вперше показано, що дисбіотичні стани супроводжуються вираженими цитодеструктивними порушеннями в епітелії тонкого кишківника. Сформульовано наукову гіпотезу про спроможність ентеровірусів ініціювати виражені апоптозні процеси в тонкому кишківнику. Встановлено здатність дисбіотичних станів сприяти розвитку асоційованих, зокрема вірусно-бактеріальних інфекцій у тварин. Моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на тлі порушення складу мікробіому кишківника дозволило зафіксувати виражені дегенеративні зміни у внутрішніх органах тварин, які особливо виразно проявлялись у печінці, набуваючи генералізованого характеру.

Вперше вивчено питання поширеності вірусів Норфолк (родина *Caliciviridae*, рід *Norovirus*) в осіб з дисбіозом. Отримані результати вказують на необхідність глибокого вивчення поширення норовірусної інфекції в нашій країні, особливо серед дітей. Досліджено питання присутності F-специфічних колифагів у зразках фекалій, отриманих від людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами.

Експериментальними дослідженнями вперше обґрунтовано доцільність використання сорбентів для профілактики дисбіотичних порушень у тварин з урахуванням вірусного фактору.

**Практичне значення одержаних результатів.** Вдосконалено спосіб приготування гелю бентоніту для медичних цілей, який дозволяє підвищити вологоутримуючу здатність даного сорбенту, його сорбційні властивості, в тому числі і для ентеровірусів, а також ступінь очищення та диспергування (Пат. 45163 Україна). Виявлено здатність гелю бентоніту при пероральному вживанні тваринами з антибіотикоіндукованим дисбіозом зменшувати тривалість виділення та інфекційну активність ентеровірусів. При моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій на тваринах встановлено гепатопротекторні властивості сорбентів на основі монтморилоніту (бентоніту).

Показана доцільність одночасного визначення як ентеровірусного геному в матеріалі, отриманому від хворих, так і виділення вірусних інфекційних агентів на культурах клітин. Проведений порівняльний аналіз методів концентрації ентеровірусів для електронно-мікроскопічної індикації дозволив рекомендувати спосіб концентрації бентонітом в якості основного, який дає можливість не лише отримати висококонцентровані препарати, але й очистити вірусні часточки в процесі концентрації. Крім того, запропонований оригінальний спосіб електронно-мікроскопічної індикації клінічних ізолятів ентеровірусів в матеріалі з низьким титром дозволив дослідити структурно-морфологічні особливості нетипованих штамів ентеровірусів.

Розроблено спосіб моделювання дисбіозу у лабораторних тварин (мишей) шляхом використання комбінації антибіотиків ампіциліну і метронідазолу та доведено ефективність застосування антисептика декаметоксину для потенціювання дії антибіотиків в процесі моделювання таких процесів.

Експериментально обґрунтовано здатність живих мультипробіотиків на основі біфідобактерій, лактобактерій та ін. скорочувати тривалість виділення вірусу поліомієліту у тварин з непорушеним мікробіоценозом кишківника в експерименті,

а також сприяти редукції цитодеструктивних змін, в тому числі апоптозних процесів в слизовій тонкого кишківника мишей.

Одержані результати наукових досліджень впроваджено в роботу клініко-діагностичної лабораторії КНП «Тернопільська університетська лікарня», в навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України; лікувально-профілактичну та наукову роботу ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАМН України; кафедри мікробіології та вірусології Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет МОЗ України»; кафедри мікробіології, вірусології та імунології з курсом інфекційних хвороб медичного факультету Ужгородського національного університету МОН України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології імені Д.П. Гриньова Харківського національного медичного університету МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Дніпропетровської медичної академії; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Основні висновки сформульовані в окремому розділі «Віром людини» Національного підручника для студентів ВМНЗ 3-4 рівня акредитації «Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія» (2020).

**Особистий внесок здобувача.** У роботі представлені результати експериментальних та параклінічних досліджень, проведених автором переважно особисто. Дисертантом самостійно обрано напрям дослідження, за консультативною участю наукового консультанта сформульовано мету, визначено завдання та обрано методи дослідження. Автор особисто провів інформаційно-патентний пошук та аналіз літературних джерел щодо проблеми дисбіотичних розладів і ролі вірусного компонента у цьому процесі, сучасних відомостей про кишковий віром людини і особливостей його взаємодії з нормальною мікрофлорою людини, а також пошуку нових підходів до експериментального моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин.

Здобувач самостійно виконав мікробіологічні та вірусологічні дослідження. Деякі дослідження – генетичні, серологічні реакції, ПЛР проводились за участю співробітників кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця: к.мед.н, доцента Понятовського В.А., к.б.н., доцента Долінчук Л.В. Дослідження, присвячені моделюванню дисбіотичних станів у тварин та використання антисептиків для формування дисбіотичних порушень проводились у співпраці з д.мед.н., доцентом кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова Назарчуком О.А.

Електронно-мікроскопічні дослідження здійснювались у лабораторії електронної мікроскопії кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця у співпраці з к.б.н., старшим інженером Олексієнком І.П. та у

лабораторії електронно-мікроскопічних досліджень Інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця МОЗ України при підтримці Стеченко Л.О., д.б.н., професора кафедри гістології НМУ імені О.О. Богомольця.

Автор самостійно написав та оформив дисертаційну роботу, разом із науковим консультантом сформулював висновки і практичні рекомендації. Співавторство інших дослідників у друкованих працях, опублікованих за матеріалами дисертації, полягало в їх консультативній допомозі та участі в спільному аналізі отриманих результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Отримані результати власних досліджень, які представлені в дисертаційній праці, висвітлювались на Міжнародному науково-практичному конгресі «Актуальні проблеми сучасної медицини» (12-14 жовтня 2011 р., м. Київ); 5-й міжнародній конференції «Біоресурси і віруси» (10-13 вересня 2007 р., м. Київ). Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми ко-інфекції туберкульоз і ВІЛ/СНІД» (29-30 березня 2011 р., м. Київ); Міжнародній науково-практичній конференції з нагоди 60-річчя створення кафедри епідеміології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Актуальні проблеми епідеміології інфекційних, паразитарних і не паразитарних захворювань» (12-13 травня 2016 р., м. Львів); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів», присвяченій 150 річчю з дня народження Данила Кириловича Заболотного (15-16 вересня 2016 р., м. Київ.); V (67) Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (23-25 жовтня 2013 р., м. Київ.); Международной научной конференции (25-27 вересня 2013 р., м. Москва); Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (23-25 жовтня 2013 р., м. Київ); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (29 січня 2018 р., м. Чернівці); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування і дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів» (20-21 вересня 2018 р., м. Вінниця); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвяченій 90-річчю акад. А.Я. Циганенка (24-26 червня 2019 р., м. Харків); науковій конференції, присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», (5 листопада 2019 р., м. Київ).

**Публікації за темою дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи відображені у 39 опублікованих наукових працях, зокрема, 24 – у фахових наукових виданнях, які рекомендовані МОН України, 2 в журналах міжнародних наукометричних баз (Web of Science та Scopus); 1 – в іноземному фаховому науковому журналі, 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій, отримано 1 патент України на корисну модель, зроблено 1 галузеве нововведення.



**Структура та обсяг роботи.** Дисертація викладена на 370 сторінках друкованого тексту, з них 271 становить основний текст; складається зі вступу, дев'яти розділів, аналізу й узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 85 рисунками, 41 таблицею. Список використаних джерел складається з 382 найменувань, 205 із яких – кирилицею, 177 – латиницею.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертаційного дослідження, розкрито її зв'язок із науковою діяльністю кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, сформульовано мету та завдання, визначено об'єкт, предмет і методи дослідження, викладено наукову новизну й практичне значення одержаних результатів, особистий внесок здобувача, наведено інформацію щодо апробацій та публікацій.

У розділі 1 проведено огляд літературних джерел проблеми дисбіотичних порушень у населення України і у світі та наданий аналіз досягнень в галузі вивчення мікробіому людини. Представлені сучасні дані про функції симбіотичної мікрофлори людини та її роль в підтриманні здоров'я. Проаналізовано нові підходи до профілактики та корекції порушень мікробіоценозу. Охарактеризовано сучасний стан вивчення людського вірому та описано особливості його взаємодії з іншими представниками мікрофлори людини.

У розділі 2 наведено матеріали та методи дослідження. Відповідно до мети та завдань наукова робота носить експериментально-параклінічний характер. Вона присвячена фундаментальним питанням, пов'язаним з формуванням дисбіотичних розладів у людей та з'ясуванню ролі вірусного фактору у цьому процесі. Вся експериментальна частина виконувалась на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця та у лабораторії електронно-мікроскопічних досліджень Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини (НДІ ЕКМ) НМУ імені О.О. Богомольця МОЗ України.

Для вирішення поставлених завдань було виконано перспективне дослідження закономірностей поширення ентеровірусів у різних категорій осіб з дисбіозом кишківника. В процесі виконання експериментальних досліджень використано перещеплювані культури клітин: HEp-2; RD; L20B; Vero. Вся робота з культурами клітин велась відповідно до методичних вказівок МОЗ України «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів». – Київ, 2007. та «Руководства по вирусологическим исследованиям полиомиелита. Глобальная программа по вакцинам и иммунизации» ВОЗ. Женева. – Москва, 1998.

У наукових експериментах під час виконання дисертаційної роботи використано вакцинні штами вірусів поліомієліту 1 типу (штам LS-c2ab), 2 типу (P712 Ch 2ab), 3 типу (штам Leon 12a1b), прототипні штами вірусів Коксакі В: Коксакі В-1 (штам Connecticut-5), Коксакі В-2 (штам Ohio-1), Коксакі В-3 (штам Nancy), Коксакі В-4 (штам Powers), Коксакі В-5 (штам Faulkner), Коксакі В-6 (штам Hammon), а також клінічні ізоляти ентеровірусів. Вся робота з штамами і ізолятами

поліовірусів, та потенційно-інфекційними матеріалами, що могли містити поліовіруси, проводилась згідно з вимогами контейнменту поліовірусів та до введення в дію Наказу МОЗ України № 237 від 24.03.2016 року «Про деякі питання застосування вакцини для профілактики поліомієліту».

Титрування вірусів проводили двома способами: мікрометодом за ТЦД<sub>50</sub> та за бляшкоутворенням під бентонітовим покриттям.

Дослідження біологічних властивостей ентеровірусів, виділених з фекальних мас осіб з дисбіотичними порушеннями, проводили шляхом визначення їх генетичних маркерів: бентонітового маркера А<sub>бент</sub>, що визначає ступінь афінитету до бентоніту; маркера S, що визначається за розміром вірусних бляшок під бентонітовим покриттям, та маркера rct<sub>40</sub> (показник здатності вірусів до репродукції при температурі 40°C).

Виявлення F-специфічних РНК-бактеріофагів (фаги MS2) та соматичних фагів кишкової палички з кількісним підрахунком проводили методом агарових шарів за Грація (1936). З метою індикації бактеріофагів використовували культури *E. coli* K12 Fr+ та *E. coli* B ДІСК 240368, що були отримані з лабораторії санітарної мікробіології ДУ Інститут громадського здоров'я ім. О.М. Марзєєва НАМН України.

З метою виявлення присутності в фекальних масах осіб з дисбіозом вірусів Норфолк використано тест-систему RIDASCREEN Norwalk-like Virus фірми r-Biopharm (Німеччина) для імуноферментного аналізу, яка передбачає виявлення антигену вірусу Норфолк. Протокол постановки імуноферментного аналізу при визначенні антигену вірусу Норфолк відповідав інструкції виробника відповідних тест-систем. Результат вважали позитивним у випадку, коли показники оптичної густини зразку були на 10% вищі рівня «cut-off» контролю. Якщо показники досліджуваного зразку були такі ж самі чи на 10% нижчі за «cut-off» контроль, то такий результат вважався негативним.

З метою встановлення можливої наявності геному ентеровірусів в зразках фекальних мас від різних категорій осіб, в тому числі і від осіб з дисбіотичними порушеннями застосовували ПЛР у варіанті зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР). РНК ентеровірусів виділяли класичним способом із культурального вірусомісного матеріалу з використанням комерційного набору «РибоСорб», фірми «Амплиценс», відповідно до інструкції виробника. У зв'язку з поганою стійкістю РНК в очищеній формі (до 4 годин при +4°C), реакцію зворотної транскрипції розпочинали одразу після її виділення. ДНК, яка є комплементарною вірусній геномній РНК, одержували за допомогою ферменту ревертази (М-MLV – зворотна транскриптаза) з набору «Реверта-R-100» («Амплиценс») відповідно до інструкції виробника. Реакційна суміш включала 20 мкл вірусної РНК, 20 мкл суміші гексануклеотидів і дезоксинуклеотидтрифосфатів (набір «Реверта-R-100») та 1 мкл ревертази з активністю 200 од/мкл. Реакцію проводили протягом 30 хв при 37°C в ампліфікаторі Perkin Elmer (США). Одержану кДНК зберігали при температурі -70°.

Реакцію ампліфікації проводили з використанням багатоканального ампліфікатору «Perkin Elmer» (США) за класичною методикою, адаптованою під наші об'єкти, відповідно до методичних рекомендацій «Порядок забору,

транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції», затверджених наказом № 662 МОЗ України від 30.07.2013 р. Аналіз ПЛР-продуктів проводили методом гель-електрофорезу у 1,5% агарозному гелі в однократному трис-ацетатному буфері з рН 8,5 (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЕДТА).

Дослідження матеріалу на дисбактеріоз проводилось згідно з методичними рекомендаціями «Микробиологическая диагностика дисбактериозов», Київ, 1986. Приготування поживних середовищ проводили відповідно до ГОСТу 10.444. 1 – 84 (СТСЭВ 3833 – 82) «Приготовление растворов, реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе». Якість отриманих поживних середовищ контролювали відповідно до діючих вимог відповідно до Інформаційного листа МОЗ України № 05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль поживних середовищ», (Київ, 2000).

Для моделювання дисбіозу на лабораторних тваринах використані 30-денні білі миші лінії Balb/c, що пройшли попередню акліматизацію в умовах віварію. Дисбіоз моделювали шляхом введення тваринам комбінації антибіотиків ампіциліну та метронідазолу разом з антисептиком декаметоксином. Всього в дослідженнях було використано 870 мишей, що розведені у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Тварини утримувалися згідно з «Санітарними правилами щодо устрою, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)». Дослідження виконані у відповідності з Гельсінською декларацією Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи медичних досліджень за участю людини. Під час експериментальних досліджень за участю лабораторних тварин дотримувались методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України і вимог біоетики відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), директив Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження». Дотримання етичних норм засвідчено комісією з біоетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (протокол №133 від 12 червня 2020 р.).

З метою вивчення морфології нетипованих штамів ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями, проводили їх електронно-мікроскопічну ідентифікацію. Уся робота виконувалась у лабораторії електронно-мікроскопічних досліджень кафедри мікробіології, вірусології та імунології та Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини (НДІ ЕКМ) Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України.

Концентрування ентеровірусів для електронно-мікроскопічних досліджень проводили за різними методиками: концентрування поліетиленгліколем-6000 (ПЕГ-600) в присутності хлористого натрію; бентонітом; ультрацентрифугуванням; з використанням гідрогельметилкремніевої кислоти (ГГМКК) та двофазного розділення.

Для приготування плівок-підложок використовували формвар та колодій, їх зміцнювали напилюванням вуглецю в умовах вакууму. Інколи, для отримання високоякісних знімків, використовували так звані «перфоровані» плівки-підложки. Досліджувані зразки піддавали негативному та позитивному контрастуванню, в залежності від цілей дослідження, в якості контрастуючих розчинів використовували 1-2% фосфорно-вольфрамову кислоту, 2% фосфорно-молібденову кислоту, 2% розчин уранілацетату та 0,59 М розчин оцтовокислого свинцю. При цьому об'єкти наносили на плівку-підложку крапельним способом. Для зменшення гідрофобності плівок-підложок, опорні сітки з підложками піддавали ультрафіолетовому опромінюванню та обробці бентонітом.

З метою електронно-мікроскопічного дослідження ультраструктурних змін в клітинах та тканинах внутрішніх органів лабораторних тварин отримували ультратонкі зрізи кишківника, печінки та селезінки модифікованим нами класичним методом: для префіксації матеріал витримували в 20 мл 4% розчину глутаральдегіду у фосфатному буфері (рН 7,4) протягом 4-6 годин при кімнатній температурі у витяжній шафі. Фіксували 2% розчином чотирьохоксиду осмію у фосфатному буфері протягом 2-4 год, після чого їх тричі по 10 хв відмивали від чотирьохоксиду осмію. Після серії зневоднення зразки витримували по 5 год у розчинах, що включали в себе робочу суміш (Epon 812, Araldit 502, DDSA у співвідношенні 1:1:2, каталізатор DMP-30 6 крапель на 10 мл) та пропіленоксид у співвідношенні 1:1 та співвідношенні 1:2. Для отримання зрізів кишківника в якості фіксатора використовували фіксатор Колфільда, в основі якого лежить фіксатор Палада з додаванням 4,5% розчину сахарози. Зрізи одержували з використанням скляних ножів на ультрамікротомі «Reichert-Jung Ultracut 701701» та досліджували в електронних мікроскопах JEM-100C-II (Японія) та EM-125K (Україна). Перед мікроскопуванням зрізи контрастували уранілацетом та цитратом свинцю.

Для статистичного аналізу одержаних даних застосовували методи варіаційної статистики: оцінки різниці між частотами появи ознаки в окремих серіях досліджень; порівняння середніх величин та середньоквадратичних відхилень. Для оцінки вірогідності різниці показників двох сукупностей, одержаних в процесі досліджень, визначали ступінь розходження їх середніх значень з використанням t-критерію Стьюдента. Статистичний аналіз проводили за допомогою стандартного пакету прикладних програм для медико-біологічних досліджень «Statistica 6,0 for Windows», EXCEL.

### **Результати дослідження та їх обговорення.**

У *третьому* розділі наведені результати параклінічних вірусологічних досліджень поширення ентеровірусів та інших кишкових вірусів (Норфолк, F – специфічних фагів) в осіб з дисбіотичними порушеннями (n=386) та зі збереженим мікробіомом (n=354). Результати тестування на культурах клітин: HEp-2 та RD дали змогу зафіксувати зростання частоти реєстрації цитопатогенних агентів в осіб з бактеріологічно підтвердженими дисбіотичними розладами, у порівнянні з особами, в матеріалі від яких не було зафіксовано порушень з боку нормальної мікрофлори кишківника. Так, у фекальних масах, взятих від осіб з дисбіозами, цитопатогенні агенти реєстрували у 56 випадках з 386 досліджених зразків (14,5%), в той час, як в

осіб, у матеріалі від яких за результатами бактеріологічних досліджень не було виявлено порушень якісного та кількісного складу нормальної мікрофлори, з 354 зразків цитопатогенні агенти виявили в 31 випадку (8,76%) ( $p < 0,05$ ).

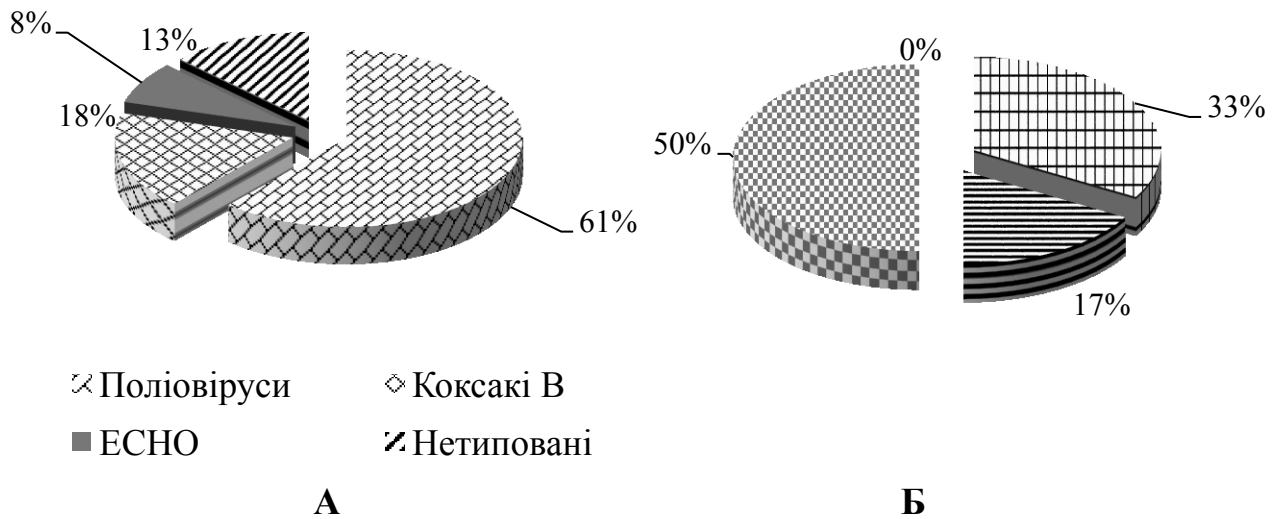
У людей з дисбіозом кишківника цитопатогенні агенти найчастіше реєструвалися у зразках, отриманих від дітей першого-другого року життя (38 випадків з 216 зразків, або 17,59%), дітей 6-7 років (5 випадків з 32 зразків, 15,63%) та підлітків 14-15 років (3 із 18 досліджених зразків, 16,67%), рідше – у дітей 3-5 років (5 зразків з 48 досліджених, 10,4%), дітей 8-13 років (2 випадки з 26 досліджених зразків, 7,69%). У дорослих та людей старших 60 р. було зафіксовано по одному випадку цитопатогенних агентів, що складає 5% та 8,3% відповідно. Частота реєстрації ЦПА у зразках, отриманих від усіх досліджуваних категорій людей, коливалась від 8,33% до 18,9%. В осіб з дисбіотичними порушеннями вона залежала від ступеня дисбіотичних проявів. Найбільшу кількість цитопатогенів виявлено у зразках фекальних мас, які отримані від різних вікових категорій осіб з 1 ступенем дисбіозу (18,9%). Найменше ЦПА відмічали при виражених змінах мікробіоценозу: при 3 та 4 ступенях дисбіотичних розладів цей показник дорівнював 8%.

За даними ПЛР наявність ентеровірусного геному у зразках, в яких вірусологічними методами було зареєстровано присутність цитопатогенних агентів, встановлено, що переважна більшість,  $n=39$  (69,6%), з 56 досліджених від осіб з дисбіозом зразків містили ентеровірусну РНК. Натомість у пробах з ЦПА ( $n=31$ ), отриманих від осіб без порушень нормальної мікрофлори кишківника, цей показник становив – 12 (38,7%) ( $p < 0,05$ ).

В категорії осіб з дисбіозами видову приналежність до ентеровірусів встановлено у 34 випадках, з них поліовірусів – 24 штами, вірусів Коксакі В – 7 штамів, вірусів ЕСНО – 3 штами. П'ять штамів з даної категорії виявились не типованими, оскільки вони не нейтралізувались жодною з використаних специфічних імунних сироваток. Всі ідентифіковані ентеровіруси в групі осіб, в яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичних порушень кишківника, були віднесені до 6 серотипів. Найбільш численну групу склали нетиповані ентеровіруси (6 штамів), на другому місці поліовіруси (4 штами), на третьому – віруси Коксакі В (2 штами) (рис. 1).

Після проведення типування виділених вірусів поліомієліту поліклональними віруснейтралізуючими сироватками встановлено, що з 24 зразків, які містили поліовіруси, 22 зразки містили поліовіруси лише одного з трьох типів, а 2 – суміші поліовірусів різних типів. Зокрема, один зразок містив віруси поліомієліту 1 та 2 типу, і один зразок містив поліовіруси 1 та 3 типу. За нашими даними, в осіб з дисбіозом найчастіше реєструються віруси поліомієліту першого серотипу (14 штамів), поліовірусів третього серотипу виділено 8 штамів, поліовірусів другого серотипу виділялось найменше: з 24 проб, позитивних на поліовіруси, лише дві містили поліовіруси 2 серотипу. Відповідно до Наказу МОЗ України № 237 від 24.03.2016 року «Про деякі питання застосування вакцини для профілактики поліомієліту» та контейнменту поліовірусів, усі зразки клінічних ізолятів вакцинних штамів вірусів поліомієліту 2 типу були знищені шляхом автоклавування у

лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця (акт №1, від 04.04.2016 р.).



**Рис. 1. Питома вага різних видів ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом (А) та від осіб з непорушеним мікробіоценозом кишківника (Б).**

Серед ізолятів вірусів Коксакі В (n=7), виділених від осіб з порушеним мікробіомом кишківника, Коксакі В6 ідентифіковано 4 штами, Коксакі В2 – два штами та Коксакі В3 – один штама. Серед ізолятів вірусів ЕСНО усі три штами були віднесені до 3 серотипу. Типоспецифічна ідентифікація ентеровірусів, виділених від осіб, в яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичних порушень, дала такі результати: з 4 штамів поліовірусів – три належали до вірусів першого серотипу і один до третього. Серед двох штамів виділених вірусів Коксакі В – один нейтралізувався типоспецифічною сироваткою з антитілами проти серотипу Коксакі В5, інший – Коксакі В1.

Віром – це комплексне поняття, яке охоплює усі присутні в організмі віруси, не тільки ентеровіруси та патогенні віруси інших груп, але й бактеріофаги. За нашими даними, частота їх реєстрації у досліджених осіб в цілому була низькою і становила від 3,62% в осіб з дисбіозом, до 4,8% у людей зі збереженою мікрофлорою, тому говорити про певні закономірності виділення бактеріофагів та розвитку дисбіотичних порушень чи кишкових розладів, на сьогодні не можна. Середня концентрація F-специфічних фагів складала  $3,6 \times 10^2$  –  $6,6 \times 10^3$  БУО/мл в осіб з дисбіозом, а в осіб з відсутністю дисбіотичних проявів вона дорівнювала  $1,1 \times 10^2$  –  $4,47 \times 10^3$  БУО/мл.

Шляхом постановки ІФА з метою виявлення антигену вірусів Норфолк (вірусів, які належать до родини *Caliciviridae*, рід *Norovirus* і за біологічними властивостями є близькими до ентеровірусів) в групі осіб з дисбіотичними розладами (n=30) виявлено присутність вірусів Норфолк (23,3%), у порівнянні з контрольною групою (група з бактеріологічно не підтвердженим дисбіозом, n=30),

(0%), ( $p < 0,01$ ). У зразках, отриманих від осіб з ВІЛ ( $n=30$ ) та від здорових людей ( $n=30$ ), антигенів вірусу Норфолк виявлено також не було.

**Четвертий розділ** присвячений вивченню генотипових та фенотипових характеристик ентеровірусних ізолятів від осіб з дисбіотичними розладами. Завданням таких досліджень було виявлення спільних ознак за генетичними маркерами у ентеровірусів, ізольованих при порушенні мікробіоценозу кишківника. Вивчення закономірностей реєстрації позитивних маркерів вірулентності у таких ізолятах можуть показати існування особливої групи ентеровірусів, здатної закономірно виділятися при дисбіотичних порушеннях.

На основі проведення аналізу генетичних маркерів вірулентності ( $rc_{40}$ , маркер  $A_{\text{бент}}$ , маркер S) усі виділені штами поліовірусів були віднесені до авірулентних (вакцинних). Показано, що за дослідженими маркерами диференціювати штами, отримані від осіб з дисбіотичними розладами та від осіб з відсутністю порушень з боку кишкового мікробіоценозу, неможливо. Разом з тим, зафіксовано зростання частоти реєстрації позитивних маркерів вірулентності у клінічних ізолятів вірусів Коксакі В, виділених при дисбіотичних станах, у порівнянні з штамами, отриманими від осіб з непорушеним мікробіоценозом. Так, за бентонітовим маркером ці показники становили 71,4% та 50% відповідно ( $p > 0,05$ ), за  $rc_{40}$  маркером 57,14% та 0% ( $p \leq 0,05$ ), S маркером 71,42% та 0% ( $p \leq 0,05$ ). Подібна закономірність встановлена і для нетипованих ізолятів: за сорбційними характеристиками до бентоніту (маркер  $A_{\text{бент}}$ ) ці показники дорівнювали 80,0% та 33,3% відповідно ( $p \leq 0,05$ ), за  $rc_{40}$  маркером 80,0% та 66,7% ( $p > 0,05$ ), S маркером 80,0% та 33,0% відповідно ( $p \leq 0,05$ ).

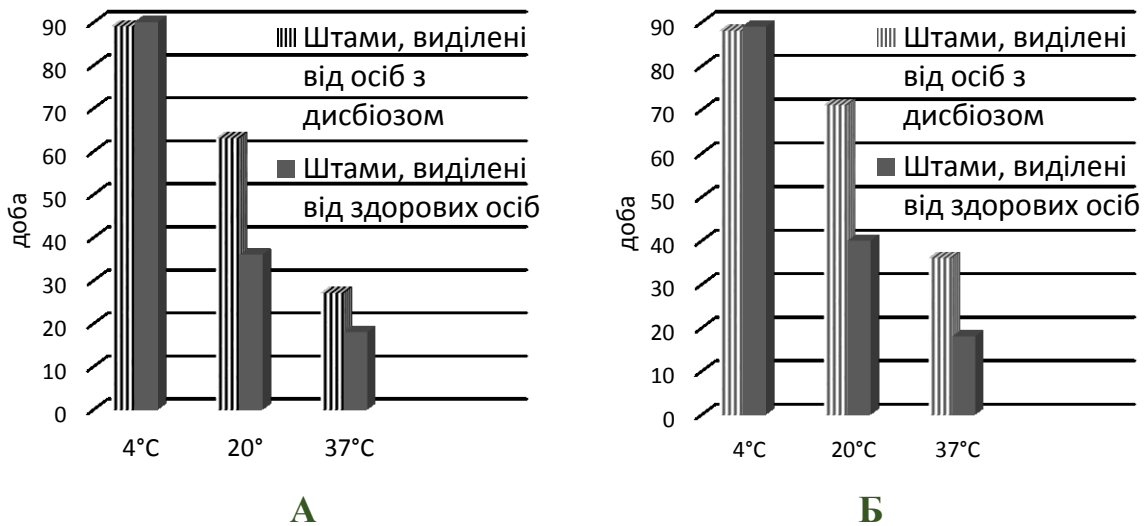
В цілому найвищий відсоток штамів з позитивними маркерами зафіксовано серед неідентифікованих ентеровірусів, виділених від людей з дисбіотичними порушеннями: 100% ізолятів даної групи мали від одного до трьох позитивних маркерів, в той час, як для неідентифікованих штамів, виділених від осіб з непорушеним мікробіоценозом ці показники дорівнювали 50% ( $p \leq 0,05$ ).

Описано певні біологічні характеристики нетипованих ентеровірусів, отриманих від осіб з дисбіозом. Для більшості з них характерним був низький афінитет до бентоніту (маркер  $A_{\text{бент}}^-$ ), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та позитивний маркер  $rc_{40}$ . Це дає підстави рекомендувати визначення генетичних маркерів для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених від людей з порушеним мікробіомом кишківника.

Крім того, зафіксовано зростання резистентності клінічних ізолятів ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом, у порівнянні з «музейними» штамами: через 90 діб зберігання при  $+4^\circ\text{C}$  титр вірусів Коксакі В3 становив  $2,75 \pm 0,17 \log \text{ТЦД}_{50}/50$  мкл, натомість титр лабораторних штамів на 90 добу спостереження складав  $1,0 \pm 0,1 \lg_{10} \text{ТЦД}_{50}/50$  мкл ( $p < 0,05$ ). Титр Коксакі В6 дорівнював  $2,5 \pm 0,13 \log \text{ТЦД}_{50}/50$  мкл та  $1,5 \pm 0,12 \lg_{10} \text{ТЦД}_{50}/50$  мкл відповідно ( $p < 0,05$ ).

Одержані експериментальні дані свідчать про те, що при температурі  $+4^\circ\text{C}$  штами ентеровірусів отримані як від здорових осіб, так і від осіб з дисбіозом здатні зберігати інфекційність протягом усього періоду спостереження (90 діб). За температури  $+20^\circ\text{C}$  ізоляти вірусів Коксакі В3 та нетиповані штами, виділені від здорових людей, зберігались інфекційними протягом 36 та 40 діб відповідно,

натомість тривалість збереження інфекційної активності у вірусів Коксакі В3 та нетипованих штамів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями зростала до 60 діб ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 2) Подібна закономірність була зафіксована при порівняльному збереженні вказаних вірусів за температури  $+37^\circ\text{C}$  ( $p \leq 0,05$ ).



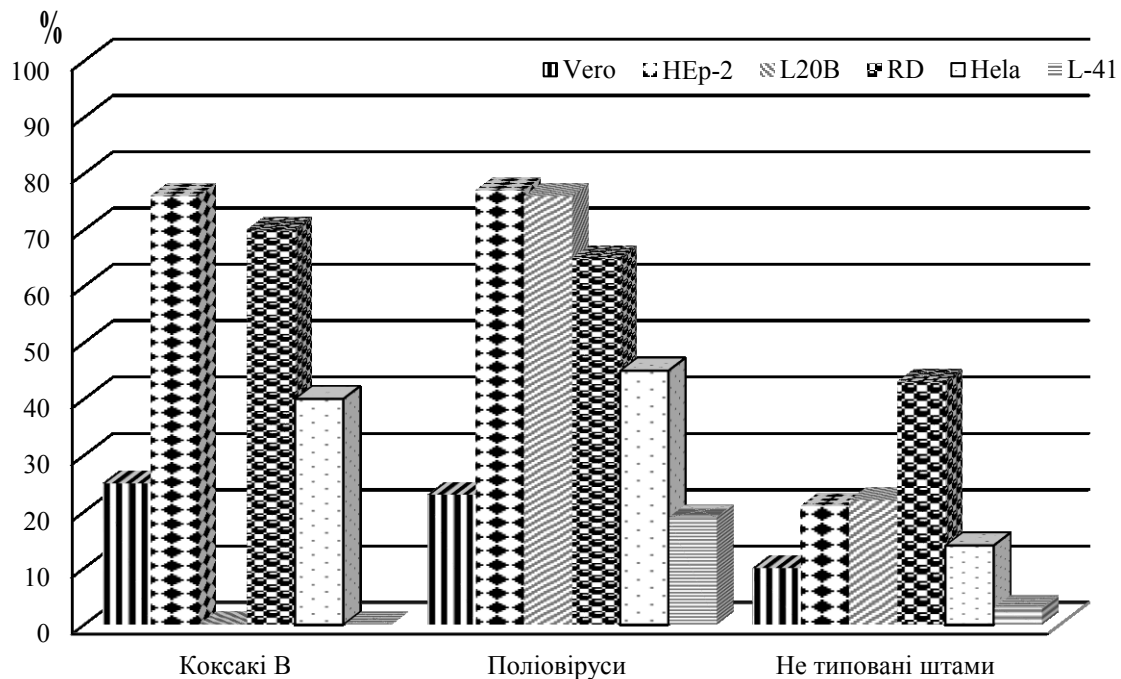
**Рис. 2. Виживаність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В3 (А) та нетипованих ентеровірусів (Б), виділених від осіб з дисбіозами та осіб з не порушеним мікробіоценозом кишківника.**

Отже, у порівнянні зі штамми від осіб з непорушеним мікробіоценозом кишківника, виділені при дисбіотичних порушеннях ізоляти вірусів Коксакі В та нетиповані ентеровіруси характеризуються зростанням частоти позитивних маркерів вірулентності ( $A_{\text{бент}}$ ,  $S^+$  та  $gct^{40}$ ), а також збільшенням тривалості збереження інфекційності, що опосередковано може свідчити про їх підвищену вірулентність.

У *п'ятому розділі* описано розроблені методичні підходи до ізоляції ентеровірусів з клінічного матеріалу, зокрема, від людей з дисбіотичними порушеннями. Експериментальними дослідженнями порівняльно визначили чутливість наступних типів перещеплюваних культур клітин: RD; HEp-2; Vero; HeLa; L20B; L41. За результатами досліджень встановлено, що інтенсивність розвитку та глибина прояву ЦПД залежить як від виду виділених вірусних агентів, так і від типу культур клітин, на яких проводилась ізоляція. Найінтенсивніше цитодеструкція проявлялася на клітинах HEp-2. Вже через 24 години після інфікування моношару з'являлися характерні ознаки репродукції ентеровірусів (ЦПД супроводжувалась подвійним світлоломленням цитоплазми клітин, появою зернистості з подальшою круглоклітинною дегенерацією моношару). Використані типи культур клітин проявляли різну чутливість при їх інфікуванні матеріалом, що містив ентеровіруси (рис. 3). Найбільш чутливими до вакцинних штамів поліовірусів виявились культури клітин L20B та HEp-2: вже через 48 год після інфікування в них відмічалась найбільш виражена цитодеструкція клітинного моношару. Порівняльний ряд чутливості клітинних культур до штамових ізолятів



поліовірусів зафіксовано в такому порядку: L20B> HEp-2> HeLa> RD> Vero> L41. Віруси Коксакі В та нетиповані штами в основному виділялися на клітинах HEp-2, HeLa та Vero.



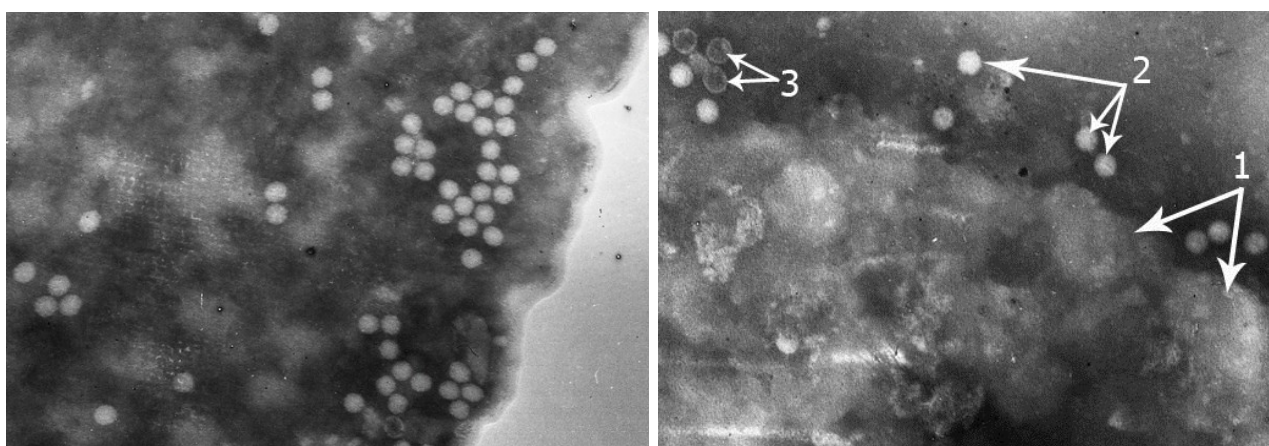
**Рис. 3. Узагальнені дані щодо порівняльної чутливості клітинних культур до ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом.**

Проведений порівняльний аналіз цитодеструктивної активності клінічних ізолятів вірусів та їх прототипних (музейних) штамів показав, що при однаковій інфікуючій дозі вірусів Коксакі В6 ( $6,25 \pm 0,15$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл) та вірусів поліомієліту ( $6,5 \pm 0,12$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл) прояв цитопатогенної дії клінічних ізолятів суттєво поступаєтья щодо вірусів, які тривалий час культивувались в лабораторії і є адаптованими до досліджуваних культур клітин. Так, після інокуляції лабораторних штамів вірусів Коксакі В6 розвиток ЦПД на лініях культур клітин RD, HeLa та HEp-2 починався через 12 годин, натомість, у культурах клітин, інфікованих клінічними ізолятами вірусів Коксакі В6, перші ознаки ЦПД реєструвались лише через 24 год. Всі отримані результати є достовірними ( $P \leq 0,05$ ).

Дослідження ентеровірусних ізолятів передбачає також вибір досконалих та ефективних методичних підходів до проведення електронно-мікроскопічного дослідження і найчастіше супроводжується концентруванням матеріалу, що в першу чергу пов'язано з низьким титром вірусу (менше  $6,0$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл). Результати порівняльного оцінювання ефективності способів концентрування показали, що усі способи (адсорбційні – бентонітом; фізико-хімічні – за допомогою ПЕГ-6000 в присутності хлористого натрію і концентрування вірусів з використанням двофазного розділення, а також фізичні – шляхом ультрацентрифугування) є придатними для концентрування вірусомісного матеріалу з метою подальших ЕМ досліджень. Разом з тим, оптимальним є метод концентрування бентонітом. Даний

метод дозволяє отримати не лише високі титри вірусів, але й в процесі концентрування очистити їх від неспецифічних забруднювачів (рис. 4А). Крім цього, в результаті проведення серії повторних дослідів статистично достовірно ( $p \leq 0,05$ ) встановлено, що частота виявлення віріонів на плівці-підложці після концентрування бентонітом була на 30-50% вищою у порівнянні з іншими способами.

Використовуючи нанесення на поверхню плівок-підложок сорбенту бентоніту, який має виражені сорбційні властивості до ентеровірусів, вдалось отримати препарати з достатньою кількістю ентеровірусів безпосередньо на плівці-підложці для візуального дослідження (рис. 4Б).



А

Б

**Рис. 4. А. Електронна мікрофотографія. Віруси поліомієліту 1 типу (клінічні ізоляти) після концентрування бентонітом. Вірусні часточки, очищені від неспецифічних забруднювачів. Б. Електронна мікрофотографія. Ентеровіруси в клінічному матеріалі. 1 – часточки бентоніту; 2 – повноцінні вірусні часточки; 3 – «пусті форми віріонів». Контрастування 1% ФВК. Збільшення 60 000×.**

В результаті подальших тривалих ЕМ спостережень було показано, що ефективність ЕМ індикації ентеровірусів залежить від терміну, який пройшов з часу забору матеріалу до проведення досліджень – чим більш він тривалий, тим нижча ймовірність ідентифікувати вірусні часточки (максимально до 3 діб). Ще одним важливим моментом є той факт, що для попередження інактивації вірусів, процес освітлення фекальних мас має здійснюватися з використанням центрифугування при 12 000 об/хв у центрифугі з охолодженням  $+4^{\circ}\text{C}$  протягом 60 хв. В цілому слід відмітити, що, не дивлячись на не високу чутливість (60% ПЛР підтверджених зразків), нами вперше показана можливість електронно-мікроскопічного дослідження клінічних ізолятів ентеровірусів з використанням плівок-підложок з сорбентом без використання попереднього концентрування вірусомісного матеріалу. В таких препаратах найчастіше спостерігали поодинокі розташування вірусних часточок. Відмічались також численні неспецифічні забруднювачі.

Запропонований спосіб дозволив порівняльно вивчити морфологію нетипованих штамів ентеровірусів, виділених від різних категорій осіб, в тому числі

і від осіб з дисбіотичними порушеннями. Доведено відповідність розмірів, структури віріону та деяких властивостей нетипованих штамів структурі та властивостям ентеровірусів, зокрема лабораторних прототипних штамів, та опосередковано підтверджено їх вищу резистентність у порівнянні з «музейними» штамми: препарати містили понад 90% вірусних часточок, які були сформовані «повноцінними» віріонами, тобто вірусними часточками з наявною нуклеїновою кислотою, і лише 5-10% виявлених вірусів віднесені до «пустих форм», або вірусів з втраченим геномом.

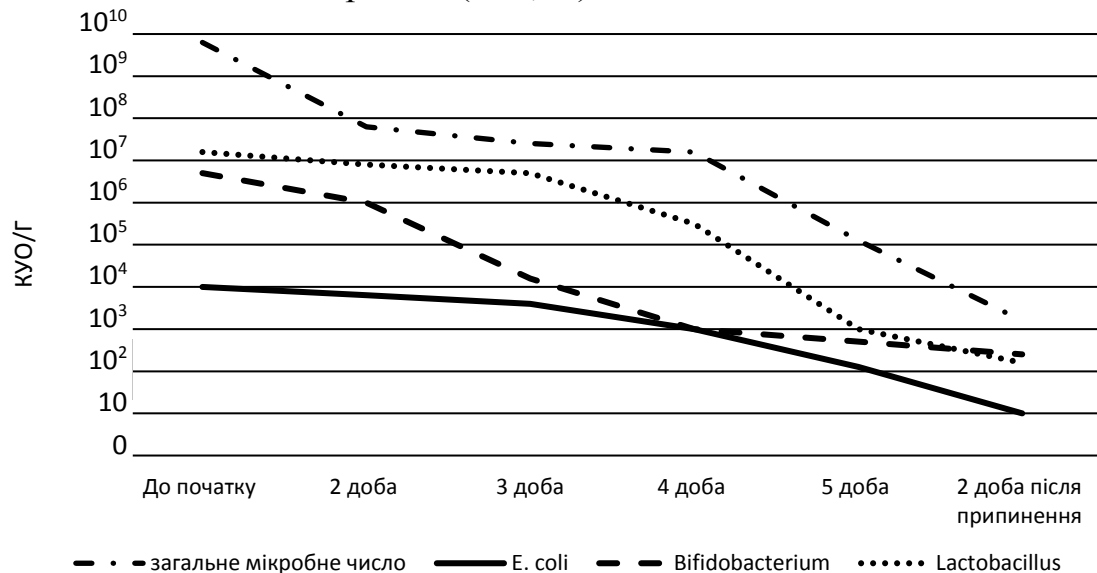
**Шостий розділ** присвячений дослідженню впливу дисбіотичних порушень на розвиток ентеровірусних інфекцій у мишей. Спочатку здійснено порівняльну оцінку способів формування дисбіозу. Показано, що найбільш виражені порушення мікробіоценозу кишківника формуються в результаті використання комбінації ампіциліну та метронідазолу (добова доза кожного дорівнювала 10 мг). Після їх п'ятиденного введення та через два дні після призупинення відмічали зниження загальної кількості мікроорганізмів з  $7,8 \pm 0,4 \times 10^9$  до  $1,8 \pm 0,4 \times 10^4$  КУО/г ( $p \leq 0,001$ ), *E.coli* з  $1,6 \pm 0,4 \times 10^6$  до  $1,2 \pm 0,8 \times 10^2$  КУО/г ( $p \leq 0,001$ ), *Bifidobacterium spp.* з  $1,8 \pm 0,6 \times 10^6$  до  $3,2 \pm 0,6 \times 10^2$  КУО/г ( $p \leq 0,001$ ) та *Lactobacillus spp* з  $2,6 \pm 0,6 \times 10^8$  до  $1,4 \pm 0,6 \times 10^2$  КУО/г ( $p \leq 0,001$ ).

Експерименти також засвідчили, що подальше збільшення дози антибіотиків принципово не змінювало мікробіологічні показники. У кожній з дослідних груп різниця показників загального мікробного числа, кишкової палички, біфідобактерій, лактобактерій протягом всього періоду експерименту статистично не відрізнялась від контрольної ( $P > 0,05$ ). Натомість, за нашими даними, збільшення дози антибактеріальних препаратів супроводжувалося зниженням ваги тварин. Так, вага мишей, які отримували препарати в дозі по 5 мг/тварину на 5, 10 та 15 добу знижувалась на  $2,0 \pm 0,12$ ,  $2,8 \pm 0,14$  та  $2,4 \pm 0,14$  г відповідно ( $P \leq 0,05$ ), в той час як вага тварин, які отримували препарати в дозі по 20 мг/тварину зменшилась на  $4,7 \pm 0,16$ ;  $5,9 \pm 0,12$  та  $5,8 \pm 0,16$  г відповідно ( $P \leq 0,05$ ).

Крім того, встановлено, що моделювання дисбіозу ампіциліном та метронідазолом у вище зазначених концентраціях з додаванням у поїлку ДКМ в концентрації 0,2 мг/мл сприяло формуванню більш виражених дисбіотичних порушень у мишей, очевидно, за рахунок потенціювання дії використаних в експерименті препаратів (рис. 5). Після п'ятиденного курсу та через два дні після призупинення використання комбінації антибіотиків та антисептиків зафіксовано зниження загальної кількості мікроорганізмів до  $5,4 \pm 0,2 \times 10^3$  КУО/г, *E.coli* до  $1,0 \pm 0,4 \times 10^2$  КУО/г, *Bifidobacterium spp.* та *Lactobacillus spp* до  $2,2 \pm 0,4 \times 10^2$  КУО/г та  $1,2 \pm 0,4 \times 10^2$  КУО/г відповідно ( $P \leq 0,05$ ). У порівнянні з результатами моделювання дисбіотичних станів лише антибіотиками, в даному випадку відмічали зниження показників загального мікробного числа з  $1,8 \pm 0,4 \times 10^4$  КУО/г при моделюванні виключно антибіотиками, до  $2,4 \pm 0,2 \times 10^3$  КУО/г при додаванні ДКМ ( $P \leq 0,05$ ), інші показники змінювались мало.

Отримані дані свідчать про відсутність статистично достовірної різниці захворюваності та смертності у групах мишей з дисбіотичними розладами та з не порушеною мікрофлорою, інфікованих Коксакі В3: смертність мишей в обох групах

визначали в межах 16,67-20,0%, а ознаки захворювання спостерігали в 23,33% випадків у тварин зі збереженою мікрофлорою та у 26,66% випадків у тварин з дисбіозом ( $P>0,05$ ). Слід відмітити, що обидві групи тварин виявились мало чутливими до вакцинних штамів вірусів поліомієліту 2 типу: смертність серед мишей цих груп не спостерігалась, а ознаки хвороби відмічались в межах 13-16% і були статистично не достовірними ( $P>0,05$ ).



**Рис. 5.** Динаміка формування дисбіотичних порушень у мишей після моделювання комбінацією ампіциліну, метронідазолу та декаметоксину.

Разом з тим, виявлено здатність живих монопробіотичних штамів *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli*, а також мультипробіотичних на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* скорочувати тривалість виділення вірусів поліомієліту у тварин з не порушеним мікробіоценозом кишківника з 14 до 8 діб ( $P\leq 0,05$ ). Отримання тваринами з дисбіозом вказаних штамів живих мікроорганізмів не впливало на динаміку звільнення їх організму від ентеровірусів: віруси в обох випадках виділялись протягом восьми діб, а їх титр у виділеннях тварин коливався в межах від 1,0 до 1,5  $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл.

Після використання таких пробіотичних мікроорганізмів, як *Bacillus subtilis*, *B. bifidum*, *Escherichia coli* у ліофілізованій формі тривалість виділення ентеровірусів у мишей з непорушеною мікрофлорою скорочувалась на 3 доби, а після використання ліофілізованої форми на основі *Lactobacillus acidophilus* – на 6 діб. Вживання ліофілізованих препаратів на основі *L. acidophilus* та *B. bifidum* не вплигло на тривалість виділення вірусу поліомієліту у тварин зі сформованим дисбіозом у порівнянні з тими тваринами, які отримували лише антибіотики ( $P>0,05$ ). В обох випадках тривалість виділення вірусу становила 8 діб. Отже, за результатами експериментальних досліджень встановлено здатність пробіотичних штамів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* та мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* скорочувати тривалість виділення вірусу поліомієліту у тварин з непорушеним

мікробіоценозом кишківника в експерименті. Натомість отримання тваринами з дисбіозом зазначених пробіотичних штамів не впливало на динаміку звільнення їх організму від ентеровірусів.

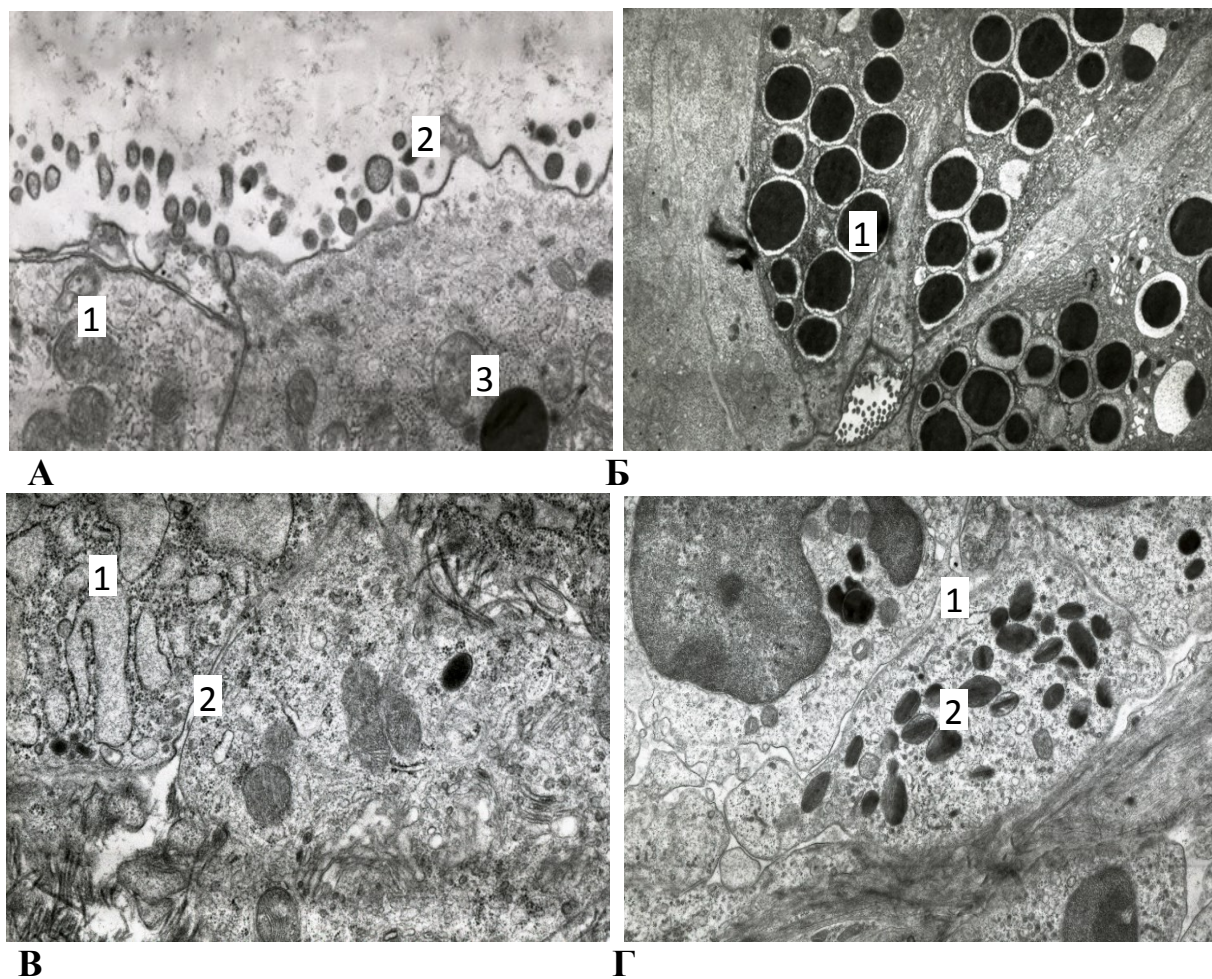
Досліджено вплив кишкової мікрофлори тварин на тривалість збереження інфекційності вірусів в умовах *in vivo*. За результатами виділення вірусів у лініях клітинних культур НEr-2, HeLa та L20В визначено середній титр вірусів, ізольованих із тонкого кишківника мишей з дисбіозом. Через дві години після інфікування поліовірусами другого серотипу (вакцинні штами) він становив  $1,42 \pm 0,12$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл, натомість середній титр вірусів, виділених із тонкого кишківника мишей зі збереженою нормальною мікрофлорою дорівнював  $2,75 \pm 0,14$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл ( $P \leq 0,05$ ). Після чотирьох годин інфікування середній титр вірусів, виділених з тонкого кишківника мишей з дисбіозом дорівнював  $1,25 \pm 0,12$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл, у порівнянні з контрольною групою ( $1,83 \pm 0,1$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл) ( $P \leq 0,05$ ).

У меншій мірі дана закономірність простежується і при вірусологічному дослідженні вмісту товстого кишківника: середній титр вірусів, виділених із товстого кишківника мишей з дисбіозом через 2 год становив  $1,17 \pm 0,1$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл, натомість за даних умов середній титр вірусів, виділених з товстого кишківника мишей із збереженою нормальною мікрофлорою, дорівнював  $1,83 \pm 0,12$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл ( $P \leq 0,05$ ). Після 4 год інфікування, дані показники дорівнювали  $1,25 \pm 0,12$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл та  $2,17 \pm 0,1$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл відповідно ( $P \leq 0,05$ ). Отже, отримані дані опосередковано свідчать про те, що дисбіоз сприяє більш швидкому звільненню організму експериментальних лабораторних тварин від ентеровірусів.

В **розділі 7** описано структурно-морфологічні зміни внутрішніх органів (тонкого кишківника, селезінки, печінки) тварин при вірусних та вірусно-бактеріальних інфекціях, які формуються на фоні експериментального дисбіозу. За даними електронно-мікроскопічних експериментів та подальшого аналізу показано, що моделювання антибіотикоіндукованого дисбіозу у експериментальних мишей супроводжується укороченням довжини мікрворсинок слизової оболонки, а місцями їх редукцією чи деструкцією з подальшим розпадом. У 20% випадків відмічалась тотальна десквамація мікрворсинок (рис. 6А). У таких клітин щіточкова облямівка була відсутня, плазматична мембрана згладжена, а у самих ентероцитах відмічали набряклість мітохондрій та формування аутофагосом. Відмічалось зростання інтенсивності просвітлення матриксу цитоплазми, витонченість замикальної пластинки контактів та порушення зв'язку між епітеліальними клітинами за рахунок розширення міжклітинного простору.

Експериментально встановлено активізацію імунних процесів, яка спостерігається на фоні формування дисбіотичних порушень, про що свідчить зростання кількості клітин Панета у порівнянні з контролем ( $6,2 \pm 0,91$  у тварин з дисбіозом та  $2,8 \pm 0,97$  у тварин контрольної групи,  $P < 0,05$ , за результатами досліджень 30 квадратів кожного зразка) (рис. 6Б). Крім цього, відмічено зростання кількості плазматичних клітин ( $3,8 \pm 0,96$  у тварин з дисбіозом та  $1,2 \pm 0,93$  у тварин контрольної групи, ( $P < 0,05$ ) за результатами досліджень 30 квадратів кожного

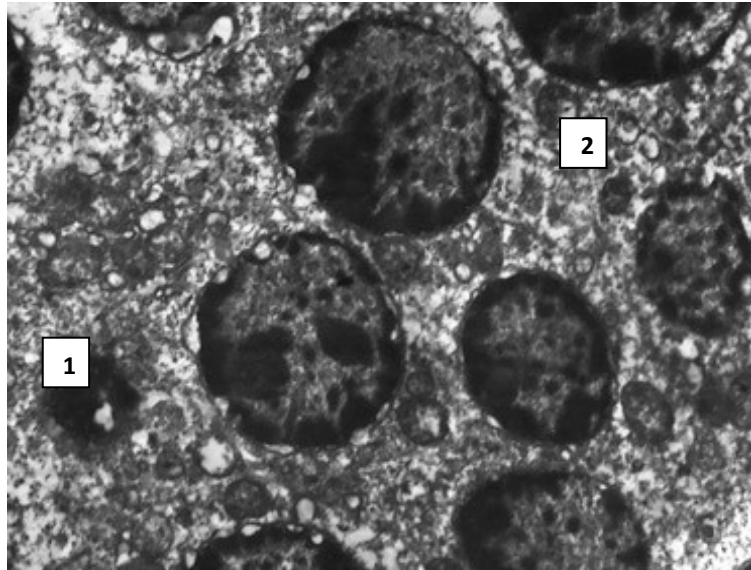
зразка, а також той факт, що на деяких електронних мікрофотографіях чітко простежується розширення каналців ендоплазматичної сітки плазматичних клітин очевидно, за рахунок наповнення їх імуноглобулінами (рис. 6В). Встановлено зростання числа просвітних еозинofilів і базофілів ( $12,6 \pm 2,4$ ) у просвіті судин тварин з дисбіозом та  $3,8 \pm 0,92$  у тварин контрольної групи,  $P < 0,05$ , за результатами досліджень 30 квадратів кожного зразка), а також зростання кількості В-лімфоцитів між ентероцитами та у просвіті капілярів,  $5,4 \pm 1,72$  та  $1,8 \pm 0,41$ , відповідно ( $P < 0,05$ ), за результатами досліджень 30 квадратів кожного зразка (рис. 6Г).



**Рис. 6. Електронна мікрофотографія. А –** Десквамовані мікрворсинки тонкого кишківника миші при антибіотикоіндукованому дисбіозі. 1 – аутофагосома; 2 – мікрворсинки; 3 – мітохондрії. **Б –** Скупчення клітин Панета після формування дисбіотичних станів. Гранули клітин Панета (1). **В –** Власна пластинка слизової оболонки. Плазматична клітина (1). Розширені каналці плазматичних клітин (2). **Г –** Еозинофіли у просвіті капіляра (1) з характерними видовженими гранулами із серцевиною (2). Збільшення 8000×.

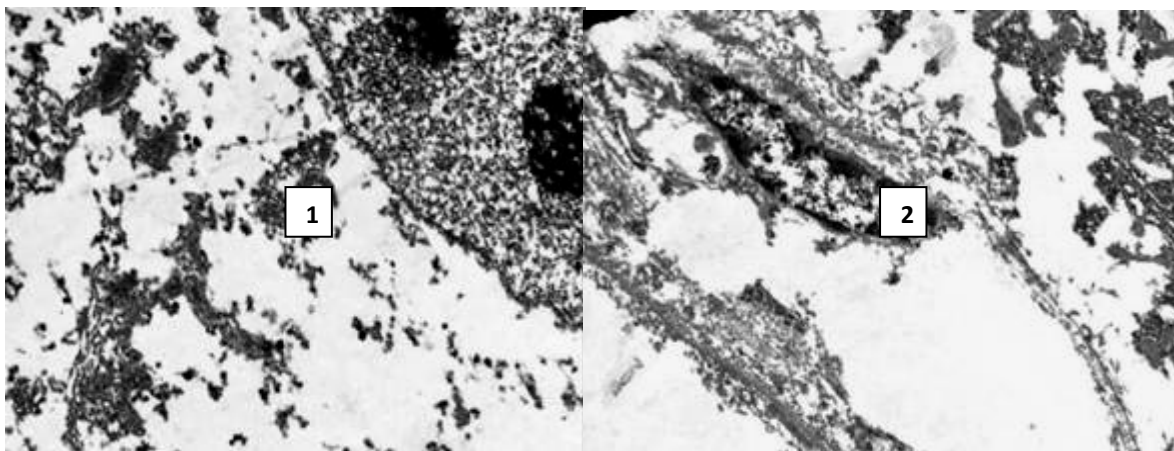
У тварин з дисбіотичними розладами, інфікованих ентеровірусами, крім морфологічних змін, характерних для дисбіозу, зафіксовано потужну активізацію апоптозних процесів. Вони проявлялись вираженим ущільненням ядер та цитоплазми ентероцитів, очевидно, за рахунок деструкції міжклітинних контактів

(рис. 7). На представлених електронних мікрофотографіях відмічались деформовані ядра з утворенням апоптозних тілець, які в подальшому зміщувались до базальної мембрани та вилучались з ряду клітин. Наразі органели таких клітин також зазнавали апоптозних змін.



**Рис. 7. Електронна мікрофотографія. Виражений апоптоз ентероцитів тонкої кишки після інфікування вірусами Коксакі В (1). Загибель ентероцитів (2). Збільшення 6000×.**

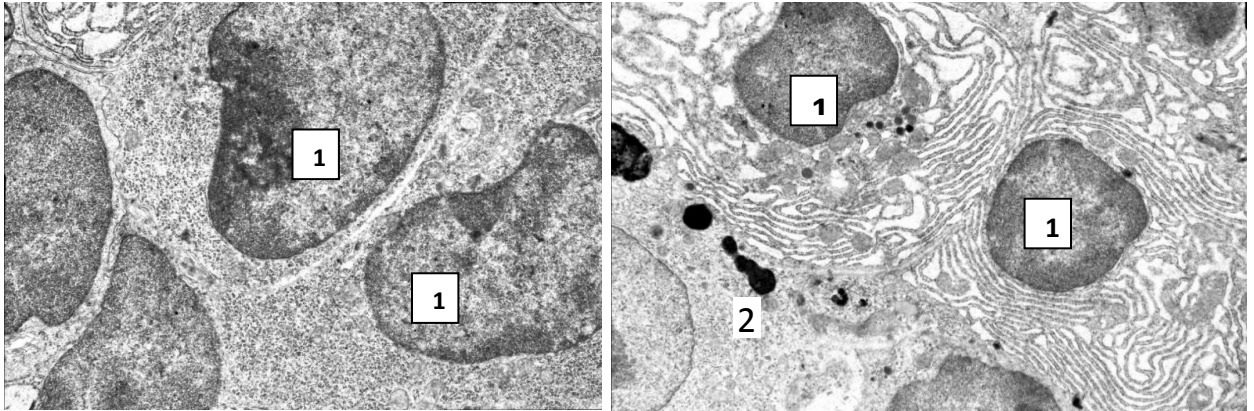
Після інфікування тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом вірусами Коксакі В3 у комбінації з *Salmonella typhimurium*, у порівнянні з контролем, найбільш виразні зміни були зареєстровані у печінці (як у синусоїдних капілярах, так і у гепатоцитах). В цих структурах розвивались некротичні процеси, що проявлялись просвітленням ядер у результаті порушення співвідношення еу- та гетерохроматину (рис. 8).



**Рис. 8. Електронна мікрофотографія. Печінка мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*. Некротичні зміни у гепатоцитах (1) і синусоїдних капілярах (2) Збільшення 12000×.**

Цитоплазма гепатоцитів характеризувалась повним або частковим цитолізом, розчиненням в основному цитозоля. Відмічали порушення структури більшості органел. Мітохондрії ущільнювались і частково або ж повністю підлягали лізису. Канальці гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки сплющувались та деструктивно змінювались, гранулярна сітка втрачала рибосоми. Деструктивних змін зазнавали і синусоїдні капіляри. На відміну від тварин з дисбіозом, інфікованих лише сальмонелами, а також здорових тварин, інфікованих вірусно-бактеріальною сумішшю, у мишей з дисбіозом при вірусно-бактеріальній інфекції відмічали також зміни морфофункціонального стану органів імунної системи. Так, в селезінці виявлено зниження об'ємної частки периартеріальних лімфоїдних муфт та збільшення частки світлих центрів лімфоїдних вузликів (рис. 9 А, Б). У такій селезінці часто відмічали присутність епітеліоїдноклітинних гранульом. Це гігантські клітини, які склалися з гіпертрофічних (у центрі гранульоми) та атрофічних (по периферії гранульоми) епітеліальних клітин. У цитоплазмі вказаних клітин також реєстрували присутність специфічних включень і, як правило, гігантські клітини були оточені лімфоцитами, макрофагами або іншими імунокомпетентними клітинами.

На основі отриманих даних сформульовано наукову гіпотезу про те, що саме вірусний фактор має провідне значення в патогенезі вірусно-бактеріальних інфекцій, змодельованих на фоні дисбіотичних процесів кишківника, поглиблюючи їх розвиток вже на ультраструктурному рівні.



А.

Б.

**Рис. 9. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В3 та *Salmonella typhimurium*. А. Скупчення лімфобластів білої пульпи (1); Б. Плазмоцити (1), фрагмент макрофага (2). Збільшення 11 200×.**

**Розділ 8** присвячений науковому обґрунтуванню використання сорбентів для регуляції мікробіому кишківника. Як показано в табл. 1, у білих мишей, які протягом досліду отримували гелеву форму бентоніту, спостерігалось зростання швидкості елімінації вакцинних штамів вірусів поліомієліту 1 типу.



**Вплив сорбентів на тривалість виділення та титр вірусів поліомієліту 1 типу (штам LS-c2ab) при моделюванні інфекційного процесу на мишах**

Доба	Титр вірусу у контрольної групи тварин (-log ТЦД <sub>50</sub> /50 мкл)	Титр вірусу у фекаліях тварин, що отримували сорбенти (-log ТЦД <sub>50</sub> /50 мкл)	
		Гелеву форму бентоніту	Гідрогель метилкремнієвої кислоти
2	3,0±0,21	3,0±0,13 (P <sub>1</sub> >0,05)	2,75±0,14 (P <sub>2</sub> >0,05)
3	2,75±0,23	2,5±0,2 (P <sub>1</sub> >0,05)	2,5±0,14 (P <sub>2</sub> >0,05)
4	2,75±0,23	2,5±0,14 (P <sub>1</sub> >0,05)	2,5±0,2 (P <sub>2</sub> >0,05)
5	2,5±0,2	2,0±0,13 (P <sub>1</sub> >0,05)	2,5±0,2 (P <sub>2</sub> >0,05)
6	2,5±2,75	1,5±0,14 (P <sub>1</sub> <0,05)	2,0±0,3 (P <sub>2</sub> >0,05)
7	2,5±0,25	1,25±0,13 (P <sub>1</sub> <0,05)	2,5±0,28 (P <sub>2</sub> >0,05)
8	2,25±0,13	1,25±0,12 (P <sub>1</sub> <0,05)	1,5±0,4 (P <sub>2</sub> >0,05)
9	2,0±0,13	-	1,5±0,25 (P <sub>2</sub> >0,05)
10	2,0±0,29	-	1,0±0,25 (P <sub>2</sub> <0,05)
11	1,25±0,14	-	1,0±0,25 (P <sub>2</sub> >0,05)
12	1,25±0,24	-	-
13	1,25± 0,3	-	-
14	1,0±0,25	-	-

Примітки: К – тварини, інфіковані вірусом поліомієліту 1 типу;

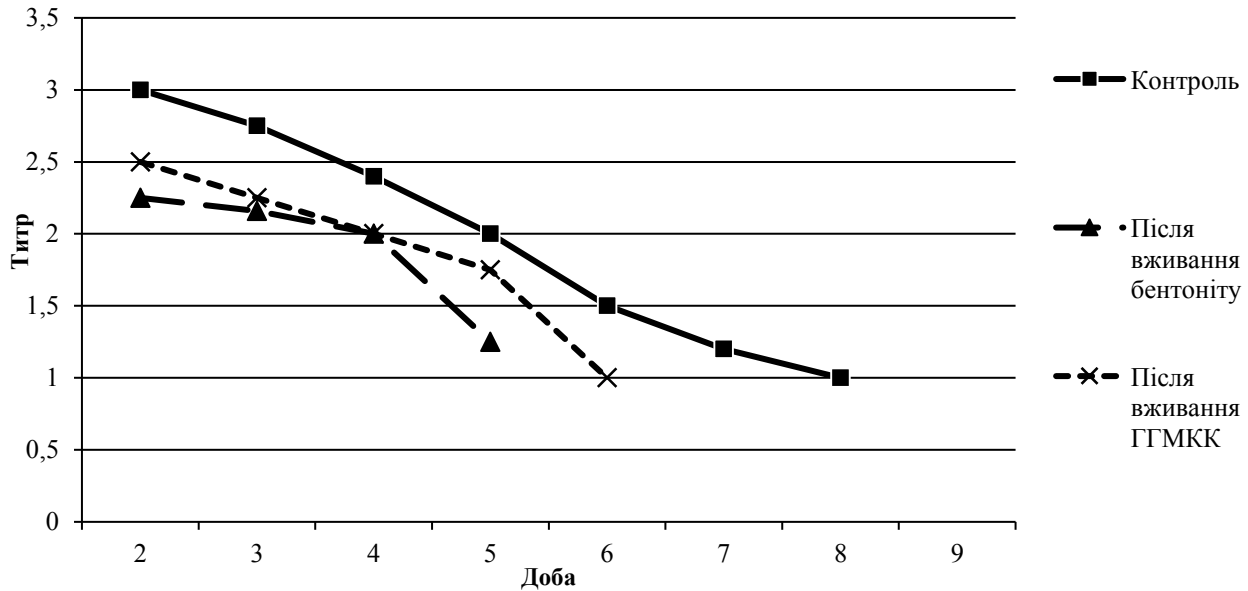
P<sub>1</sub> – достовірність різниці титрів вірусів у мишей які отримували бентоніт в порівнянні з показниками мишей які знаходились на звичайному харчуванні. P<sub>2</sub> – достовірність різниці титрів вірусів у мишей які отримували гідрогель метилкремнієвої кислоти в порівнянні з показниками мишей які знаходились на звичайному харчуванні.

Такі тварини виділяли вірус протягом 8 діб (титр вірусу на 8 добу дорівнював 1,25±0,12 -log ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл), натомість у тварин контрольної групи елімінація вірусу тривала протягом 14 діб (титр вірусу на 14 добу становив 1,0±0,21 -log ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл), P≤0,05. Контрольною групою були тварини, яким інокульовано поліовірус 1 типу (штам LS-c2ab) без використання сорбентів.

Після перорального отримання тваринами гідрогелю метилкремнієвої кислоти тривалість елімінації вірусу становила 11 діб (титр вірусу на 11 добу дорівнював 1,25±0,25 -log ТЦД<sub>50</sub>/50 мкл), що на 3 доби менше, у порівнянні з контролем, P≤0,05.

Дослідження впливу сорбентів на швидкість елімінації вірусів поліомієліту у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом показали також зростання даного показника після використання обох препаратів (рис. 10). Так, тварини контрольної групи (тварини з антибіотикоіндукованим дисбіозом кишківника) виділяли вірус поліомієліту протягом 8 діб (титр вірусу на восьму добу становив 1,0±0,25 -log ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл), натомість в групах тварин, які на фоні дисбіотичних порушень

отримували гелеву форму бентоніту, вона становила 5 діб (на п'яту добу титр вірусів складав  $1,25 \pm 0,12$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл),  $P \leq 0,05$ , а тварин, які отримували ГГМКК – 6 діб (на шосту добу титр вірусів становив  $1,0 \pm 0,21$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл),  $P \leq 0,05$ .

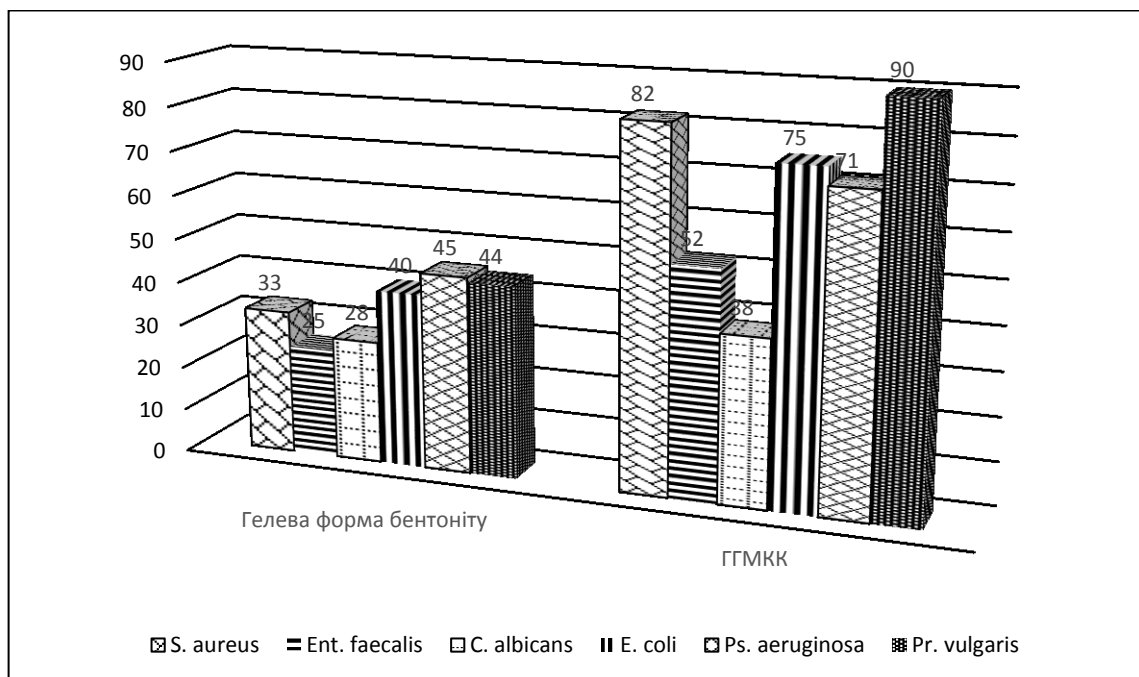


**Рис. 10. Вплив сорбентів на тривалість виділення вірусів поліомієліту у мишей з антибіотикоіндукованим дисбіозом.**

Примітки: контроль: тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом кишківника; титр виражений в  $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/50 мкл.

Таким чином, результати наших експериментальних досліджень доводять здатність сорбенту на основі гелевої форми бентоніту знижувати концентрацію ентеровірусів у виділеннях у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом. На п'яту добу отримання тваринами гелевої форми бентоніту титр вірусів дорівнював  $1,25 \pm 0,18$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/50 мкл, в контрольній групі  $2,0 \pm 0,1$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл ( $P \leq 0,05$ ). Після отримання тваринами сорбенту на основі ГГМКК, на 5 добу ці показники дорівнювали  $1,75 \pm 0,14$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл та  $2,0 \pm 0,1$   $-\log$  ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл відповідно ( $P > 0,05$ ).

Дані сорбційної здатності ентеросорбентів стосовно мікроорганізмів свідчать про те, що найбільш активно гідрогель метилкремнієвої кислоти зв'язував *P. vulgaris* УКМ В-905. і *S. aureus* УКМ В-918, 90% і 82% відповідно (рис. 11). Меншою мірою – *E. coli* УКМ В-906, *P. aeruginosa* УКМ В-900, 75% та 71% відповідно. Найгірше він сорбував *E. faecalis* УКМ В-915, *Candida albicans* УКМ В-2681 – 52% та 38%, відповідно. У порівнянні з ГГМКК, сорбційна активність гелевої форми бентоніту щодо використаних в експерименті штамів мікроорганізмів була значно нижчою і коливалась в межах 27-45% ( $p \leq 0,05$ ).



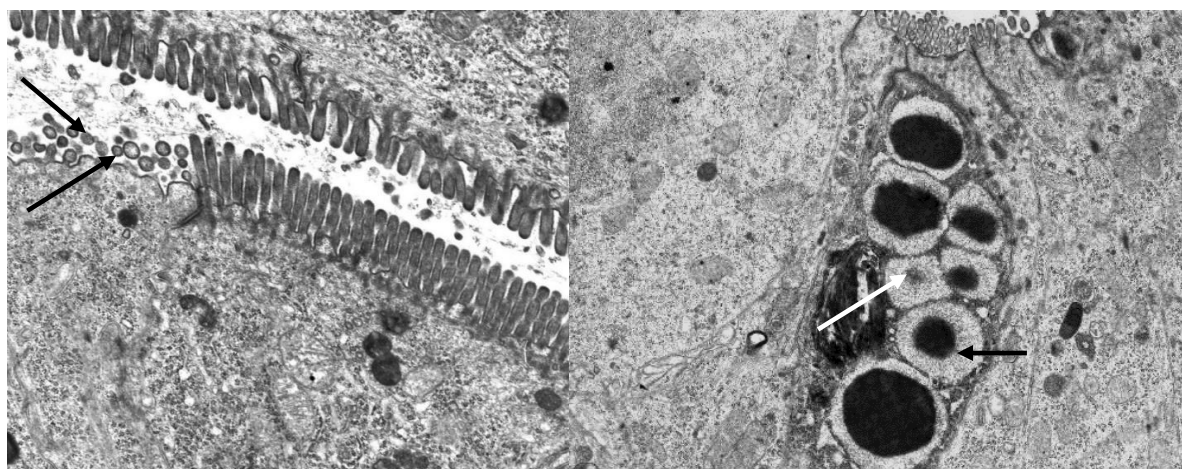
**Рис. 11. Показники сорбційної здатності гелевої форми бентоніту та ГГМКК відносно тестових мікроорганізмів (%).**

Оцінка ефективності використання вірусних сорбентів з метою регуляції мікробіоценозу кишківника не може бути якісною без вивчення їх загального впливу на деякі фізіологічні показники організму тварин. В цьому напрямку нами проведено дві серії експериментів. У першій – задіяно 50 мишей (термін спостереження 2,5 роки), у другій – 60 (термін спостереження 2 роки). Впродовж усього періоду спостережень в дослідних групах тварин (60 мишей) при вживанні гелю бентоніту не відмічали прояву жодних клінічних симптомів гострої чи хронічної інтоксикації. Крім цього, у мишей, які отримували гелеву форму бентоніту, спостерігався більш виражений приріст маси тіла, хоча він статистично не значно відрізнявся від контрольної групи тварин ( $p < 0,05$ ). У продовж всього періоду спостереження смертність серед тварин контрольної групи була вищою, ніж дослідної групи. У першому експерименті дана різниця становила від 3,7% до 19,7%. У повторному досліді – від 10% до 23,4%. Таким чином, використання гелевої форми бентоніту має позитивний вплив на організм дослідних тварин (білі лабораторні миші лінії BALB/c), що виражається у значному зменшенні їх смертності.

В *дев'ятому* розділі представлені результати експериментального обґрунтування ефективності використання мультипробіотичних препаратів на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* і *Acetobacter* та сорбенту на основі бентоніту для профілактики структурно-морфологічних порушень при дисбіозі кишківника.

За даними електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що в слизовій оболонці тонкої кишки мишей з дисбіозом після використання мультипробіотиків відмічалось згасання проявів цитодеструктивних порушень, а саме – зменшення

кількості десквамованих мікрворсинок у полі зору з  $65 \pm 9,1\%$  до  $12,8 \pm 2,4\%$  ( $p \leq 0,05$ ), переважна більшість ентероцитів зберігала щіточкову облямівку. При цьому десквамація мікрворсинок мала локальний характер з частковою відсутністю щіточкової облямівки та незначним вирівнюванням плазматичної мембрани (рис. 12А). Разом з тим, у порівнянні з контролем, встановлено зростання інтенсивності утворення аутофагосом в ентероцитах,  $12,4 \pm 1,82$  та  $5,1 \pm 1,32$  відповідно ( $p \leq 0,01$ ), за результатами досліджень 30 квадратів кожного зразка. При цьому зафіксовано відсутність ознак зміщення клітин до базальної мембрани, ущільнення цитоплазми, органел і попередників апоптозних тілець, а також інших апоптичних порушень. Встановлено, що використання пробіотичних препаратів супроводжувалось специфічними змінами у клітинах Панета: їх гранули, які, очевидно, містили дефензини, поступово втрачали свій вміст та трансформувалися у структури з електронно-прозорим обідком (рис. 12 Б). Такі гранули можна розглядати як об'єкти, що знаходяться на різних етапах функціональної активності і, вірогідно, представлені білками. Одержані дані можуть свідчити про здатність пробіотичних препаратів при одночасному введенні в організм тварин з комплексом антибіотиків стимулювати імунну відповідь організму. Крім того, на відміну від контролю, розширення каналців плазматичних клітин за рахунок їх наповнення антитілами не було зафіксовано. Кровоносні судини залишились також без змін. Водночас при використанні пробіотиків відмічали зменшення кількості еозинофілів і базофілів,  $12,6 \pm 2,4$  та  $5,4 \pm 1,15$  відповідно ( $p \leq 0,05$ ).



А.

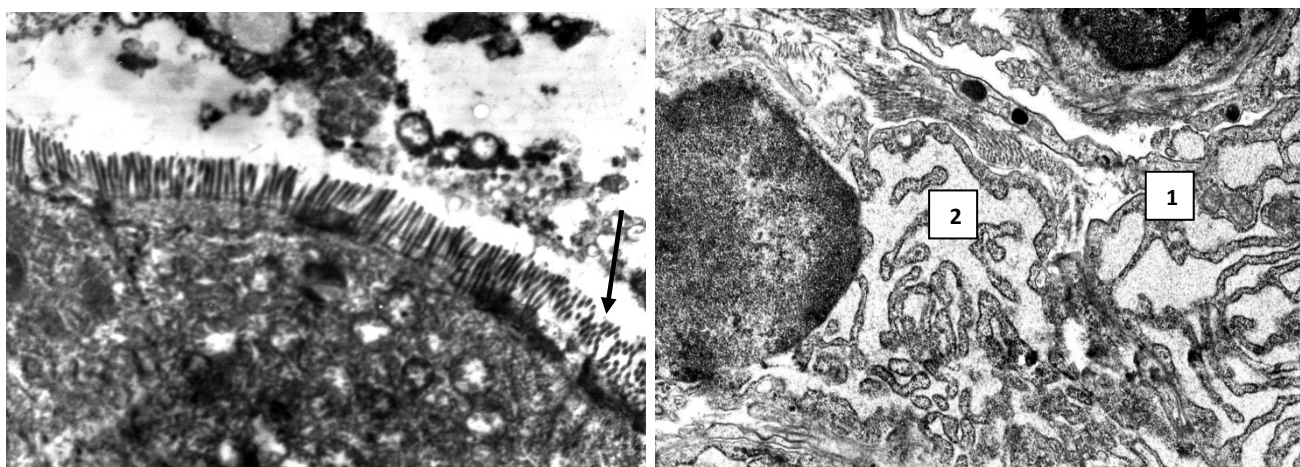
Б.

**Рис. 12. А. Електронна мікрофотографія. Локальна десквамація мікрворсинок з частковою відсутністю щіточкової облямівки (↑) та незначним вирівнюванням плазматичної мембрани у тварин з дисбіозом після використання пробіотиків. Збільшення  $10000\times$  Б. Клітини Панета, трансформовані у структури з електронно-прозорим обідком (↑). Збільшення  $6000\times$ .**

В результаті ультраструктурного аналізу слизової оболонки тонкого кишківника мишей, формування дисбіозу у яких відбувалось на фоні вживання

гелевої форми бентоніту, встановлено зниження виразності структурних ушкоджень, у порівнянні з контрольною групою тварин. Хоча місцями у слизовій оболонці тонкого кишківника і спостерігали вкорочення довжини мікрворсинок, випадків повної їх десквамації або розпаду зафіксовано не було (рис. 13А). В цілому слід відмітити, що використання гелевої форми бентоніту для профілактики дисбіотичних розладів сприяє активізації плазматичних клітин, які слід розглядати як показники активності імунної відповіді в цілому, про що свідчить виявлення плазматичних клітин з розширеними каналцями (рис. 13Б). Водночас з боку кровоносної системи змін також не відмічалось, і цілком ймовірно, що розвиток антибіотикоіндукованого дисбіозу не відображається на гемомікроциркуляторному руслі.

Крім вище зазначених позитивних змін, нами експериментально встановлено здатність мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* у мишей з дисбіозом, інфікованих ентеровірусами, сприяти редукції процесів апоптозу в тонкому кишківнику, в той час як застосування сорбентів супроводжувалось лише достовірним ( $p \leq 0,05$ ) зменшенням числа десквамованих мікрворсинок та згасанням дистрофічних змін у власній пластинці слизової і підслизовій, проте не впливало на апоптозні зміни з формуванням передапоптозних та апоптозних тілець. Подібні результати зі збереженням локальних апоптозних формувань були отримані і при моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій у тварин на фоні дисбіозу.



А.

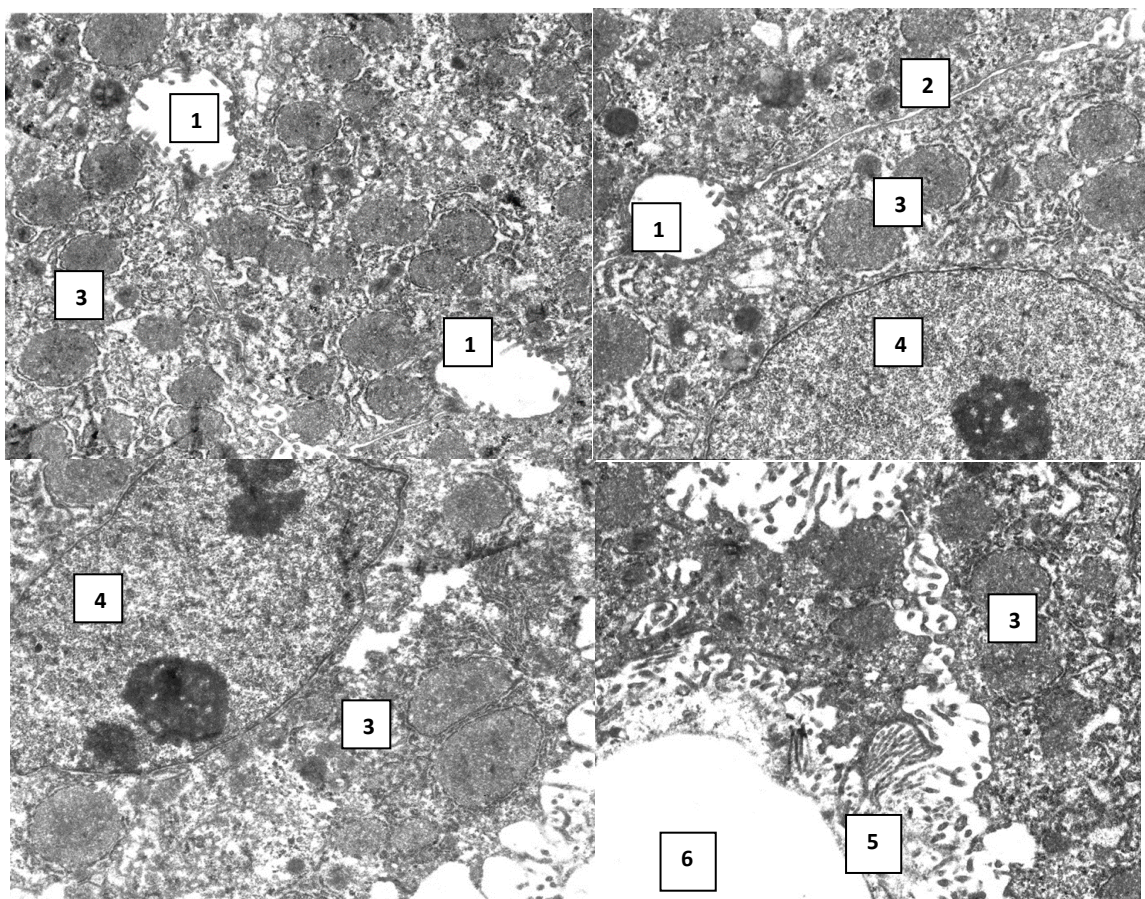
Б.

**Рис. 13. А. Електронна мікрофотографія. Локальна десквамація мікрворсинок з частковою деструкцією мікрворсинок (↑) та не вираженою згладженістю плазматичної мембрани ентероцитів. Збільшення 8000×. Б. Плазматичні клітини (1) з розширеними каналцями (2). Збільшення 12000×.**

Застосування мультипробіотиків в процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу суттєво не впливало на структуру селезінки: біла пульпа представлена характерними для неї клітинами: В-лімфоцитами, лімфоцитами, плазмоцитами, макрофагами, незначною кількістю

Т-лімфоцитів, дендритними, інтердигітантними та ретикулярними клітинами. Серед них інколи реєстрували апоптозно змінені клітини та апоптозні тільця. В клітинах печінки відмічалась певна нормалізація, проте спостерігались і неспецифічні зміни, які свідчили про активацію процесів, що відбуваються у цьому органі. В препаратах виявлені гепатоцити з великими округлими ядрами, у яких переважав еухроматин, тобто вони знаходились в активному стані; у цитоплазмі цих клітин була присутня велика кількість як вільних рибосом, так і прикріплених на канальцях гранулярної ендоплазматичної сітки.

В процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу доведено ефективність профілактичного використання ентеросорбентів та встановлено гепатопротекторну властивість сорбенту на основі бентоніту, спрямовану на збереження ультраструктурної організації печінки. Це підтверджено електронно-мікроскопічними дослідженнями: після використання гелевої форми бентоніту переважна більшість жовчних капілярів мали розширений просвіт, практично у всіх мітохондріях крипти, на яких власне відбувається синтез АТФ, були структурно не вражені, виявлялись дещо розширені зони простору Діссе (рис. 14).



**Рис. 14.** Електронна мікрофотографія. Печінка мишей зі змодельованим дисбіозом, інфікованих Коксакі В та *Salmonella typhimurium*, після використання гелевої форми бентоніту. Просвіт жовчних капілярів (1), контакт гепатоцитів (2), мітохондрії (3), ядро гепатоцита (4), простір Діссе (5), просвіт капіляра (6). Збільшення 14000 $\times$ .

У порівнянні з тваринами, які не отримували сорбенти, після використання гелевої форми бентоніту зафіксовано відсутність розвитку некротичних процесів, цитолізу гепатоцитів, масової деструкції органел, зокрема мітохондрій, які в контролі ущільнювались і підлягали лізису, а також деструктивних змін каналців гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки та втрати рибосом. В цілому, структурна організація гепатоцитів і кровоносних судин була збережена.

Отже, результати представлених досліджень показали здатність пробіотичних препаратів та сорбентів сприяти зменшенню глибини цитодеструктивних порушень при моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу та нормалізації імунних реакцій організму, які супроводжують розвиток таких процесів. Разом з тим, профілактичний ефект пробіотиків більш виражений у кишківнику, а сорбентів – на рівні структурної організації печінки.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі за результатами параклінічних і експериментальних досліджень здійснено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення важливої наукової проблеми – з'ясування ролі ентеровірусів при порушенні кишкового мікробіому, та на основі проведених досліджень науково обґрунтовано нові підходи до корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору.

1. На підставі вірусологічних та молекулярно-генетичних досліджень фекальних мас здорових осіб та людей з дисбіозом встановлено закономірну присутність в них вірусних агентів (ентеровіруси, норовіруси, бактеріофаги). В експерименті на мишах на прикладі ентеровірусів доведено взаємодію вірому та бактеріального мікробіому кишківника в нормі та в умовах дисбіозу.

2. Комплексними вірусологічними дослідженнями 740 зразків клінічного матеріалу доведено збільшення частоти виділення ентеровірусів від осіб при дисбіотичних розладах майже у 3 рази (8,9% в осіб з дисбіозом та 3,3% в контрольній групі) ( $p \leq 0,05$ ). Ентеровіруси при дисбіозах представлені поліовірусами (61%), вірусами Коксакі В (18%), вірусами ЕСНО (8%), а також нетипованими штамами (13%).

3. Досліджено поширеність вірусів Норфолк (родина *Caliciviridae*, рід *Norovirus*) у різних категорій осіб та показано зростання частоти реєстрації вірусу Норфолк до 23,3% в дітей з дисбіотичними розладами, на відміну від осіб з непорушеним мікробіомом кишківника – 0% ( $p \leq 0,05$ ), що свідчить про необхідність глибокого вивчення поширення норовірусної інфекції в нашій країні, особливо серед дітей.

4. Вивчено питання присутності F-специфічних коліфагів у зразках фекалій, отриманих від людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами. Показано, що частота виділення F-специфічних коліфагів у зразках фекалій людей не перевищує 3,62-4,8 %, незалежно від наявності дисбіотичних порушень.

5. Виявлені фенотипові та генотипові зміни ентеровірусів в умовах дисбіозу. Порівняно зі штамми, які персистують у здорових осіб, виділені при дисбіотичних порушеннях ізоляти вірусів Коксакі В та нетиповані ентеровіруси характеризуються зростанням частоти позитивних маркерів  $A_{\text{бент}}$ , S+ та  $gct^{40}$ , що опосередковано може свідчити про їх підвищену вірулентність. Для фенотипових ознак ентеровірусів, виділених від пацієнтів з дисбіозом, притаманні низький афінитет до бентоніту (маркер  $A_{\text{бент}}^-$ ), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та переважання позитивного маркера  $gct^{40}$ .

6. Запропоновано ефективні методичні підходи для вивчення вірусних ізолятів (ентеровірусів, бактеріофагів, вірусів Норфолк), виділених при дисбіозі. Зокрема, обґрунтовано доцільність використання комбінації найбільш чутливих клітинних культур для ізоляції з фекальних мас та видової ідентифікації ентеровірусів від осіб з дисбіотичними розладами. Розроблено оригінальні способи ефективної електронно-мікроскопічної верифікації ентеровірусів при дослідженні вірусовмісного матеріалу з низьким титром ( $-\log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  нижче  $10^6$ ), що дозволило охарактеризувати морфологію нетипованих штамів ентеровірусів.

7. Створена і експериментально обґрунтована модель формування дисбіозу у мишей шляхом використання комбінації антибіотиків ампіциліну і метронідазолу та доведено ефективність застосування антисептика декаметоксину для потенціювання дії антибіотиків в процесі моделювання таких процесів.

8. Встановлено здатність пробіотичних штамів біфідобактерій, лактобактерій, ешерихій та мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* скорочувати тривалість виділення вірусу поліомієліту у тварин з непорушеним мікробіоценозом кишківника в експерименті.

9. Вдосконалено спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей, що дозволяє підвищити його сорбційні властивості, в тому числі для ентеровірусів, ступінь його очищення, диспергування. Доведено позитивну дію даного сорбенту на фізіологічні показники мишей, що проявляється зростанням середньої тривалості життя і збільшенням кількості потомства. Показано здатність гелю бентоніту при пероральному вживанні тваринами з антибіотикоіндукованим дисбіозом зменшувати тривалість виділення та інфекційну активність вірусів поліомієліту.

10. Сформульовано наукову гіпотезу про спроможність ентеровірусів ініціювати виражені апоптозні процеси в тонкому кишківнику та некротичні зміни генералізованого характеру у печінці, які характеризуються просвітленням ядер, повним або частковим цитолізом цитоплазми гепатоцитів, а також ущільненням та деструкцією більшості органел.

11. На моделі антибіотикоіндукованого дисбіозу на ультраструктурному рівні доведена здатність мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* зменшувати цитодеструктивні зміни в слизовій тонкого кишківника мишей та нормалізувати морфоімуногенез. Профілактичне використання мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* у мишей з дисбіозом,



інфікованих Коксакі В3, супроводжується редукцією ініційованих вірусами процесів апоптозу в тонкому кишківнику.

12. В процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу обґрунтовано ефективність профілактичного використання ентеросорбентів та встановлено гепатопротекторну властивість гелевої форми сорбенту бентоніту, спрямовану на збереження ультраструктурної організації печінки, що підтверджено електронно-мікроскопічними дослідженнями.

## **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

Комплексними експериментально-параклінічними дослідженнями доведена активна взаємодія вірому і мікробіому при ентеровірусних інфекціях. Це є підставою для рекомендації паралельного дослідження на патогени бактеріальної і вірусної природи. У дітей з бактеріологічно підтвердженими порушеннями складу мікробіоценозу кишківника рекомендовано проводити молекулярно-генетичні або імунологічні дослідження, спрямовані на індикацію вірусів Норфолк у фекальних масах.

Ентеросорбенти сприяють прискореному виведенню і санації кишківника щодо ентеровірусів. Розроблений метод одержання гелю бентоніту для медичних цілей дозволяє підвищити вологоутримуючу здатність даного сорбенту, сорбційні властивості, в тому числі й для ентеровірусів, а також ступінь очищення та диспергування, використовується для промислового виробництва препарату «Симбіогель» (попередня назва «Смектовіт®»), який рекомендований для лікування ентеровірусних та інших кишкових вірусних інфекцій.

Обґрунтовано доцільність одночасного визначення як ентеровірусного геному в матеріалі, отриманому від осіб з дисбіозом, так і виділення вірусних інфекційних агентів на культурах клітин. Внутрішньотипову диференціацію ентеровірусних ізолятів пропонується проводити вірусологічним методом з аналізом генетичних маркерів вірулентності.

Для електронно-мікроскопічної індикації клінічних ізолятів, в тому числі і не типованих штамів ентеровірусів в матеріалі з низьким титром, запропоновано використовувати плівки-підложки з сорбентом бентонітом.

З метою формування експериментального дисбіозу у лабораторних тварин (мишей) пропонується використовувати антибіотики ампіцилін і метронідазол в комбінації з антисептиком декаметоксином.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

(\* – особистий внесок здобувача)

1. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Ширококов В. П. Кишковий віром та нормальна мікрофлора: особливості взаємодії. Аналі Інституту Мечнікова. 2015. №2 . С. 25-29. (\* – літературний пошук та висновки).

2. Бобир В. В., Понятовський В. А., Настенко В. Б. Порівняльне дослідження динаміки збереження інфекційності лабораторних штамів та клінічних ізолятів вірусів Коксакі В. Вісник морфології. 2016. №2 (Т. 22). С. 240-242. (\* – дослідження динаміки збереження інфекційності ентеровірусів, узагальнення результатів, оформлення статті).

3. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Ширококов В. П. Способи моделювання дисбіотичних порушень на лабораторних тваринах. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2015. № 26. С. 230-233. (\* – проведення досліджень, статистичний аналіз результатів та підготовка статті до друку).

4. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Ширококов В. П. Нові дані про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування. Вісник морфології. 2015. №2. Т. 21. С. 531-537. (\* – літературний пошук та узагальнення).

5. Ентеровіруси: проблеми на шляху ерадикації поліомієліту / В. П. Ширококов, В. І. Задорожня, О. І. Євтушенко, В. В. Бобир, Л. М. Гриценко // Сучасні інфекції. 2008. №3. С. 61-70. (\* – аналіз біологічних властивостей ентеровірусів, участь у написанні статті).

6. Shirobokov V. P. Enteric viruses have spread the word HIV-infected / V. P. Shirobokov, V. V. Bobyr, S. I. Doan, A. M. Shcherbinskaya, V. A. Poniatovski. Preventive medicine. 2012. №1 (17). P. 22-25. (\* – проведення досліджень, узагальнення та аналіз результатів).

7. Порівняльна чутливість культур клітин до клінічних ізолятів ентеровірусів / В. В. Бобир, В. А. Понятовський, О. А. Назарчук, О. М. Дюжикова, В. П. Ширококов, Л. В. Долінчук. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2016. №26. С. 88-91. (\* – визначення чутливості культур клітин до ентеровірусів, підготовка статті до друку).

8. Понятовський В. А., Ширококов В. П., Бобир В. В. Порівняльна чутливість перещеплених культур клітин до ентеровірусів виділених із стічних вод. Український науково-медичний молодіжний журнал. Спеціальний випуск №3. 2012. С. 11-14. (\* – аналіз та узагальнення результатів, статистична обробка результатів).

9. Бобир В. В. Порівняльна оцінка способів моделювання дисбіотичних порушень на лабораторних тваринах. Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. 2015. №24 (3). С.175-179.

10. Понятовський В. А., Бобир В. В., Настенко В. Б. Моделювання ентеровірусних інфекцій у мишей з дисбіозом. Український науково-медичний молодіжний журнал. 2015. №2 (88). С. 19-22. (\* – проведення досліджень та підготовка статті до друку).

11. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis / V. V. Bobyr, V. A. Poniatovskyi, A. P. Chobotar, L. O. Stechenko, O. I. Kryvosheyeva, O. A. Nazarchuk, O. O. Kovalenko. Reports of Morphology. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31. (\* – проведення електронно-мікроскопічних досліджень, статистичний аналіз, написання статті).

12. Понятовський В. А., Бобир В. В. Поширеність ентеровірусів в стічних водах (огляд літератури). Вісник наукових досліджень. 2012. №1. С. 12-14.

(\* – узагальнення, написання фрагменту статті «Стійкість в навколишньому середовищі»).

13. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Ширококов В. П. Вплив нормальної мікрофлори на тривалість виділення вірусу поліомієліту у мишей з дисбіозом. Профілактична медицина. 2016. №1-2. С. 47-51. (\* – дослідження тривалості виділення ентеровірусів у тварин, узагальнення результатів, оформлення статті).

14. Понятовський В. А., Бобир В. В., Ширококов В. П. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції для виявлення ентеровірусів у стічних водах. Профілактична медицина. 2012. № 3–4. С. 33-36. (\* – проведення порівняльного аналізу вірусологічного та молекулярно-генетичного методу індикації ентеровірусів в матеріалі).

15. Бобир В. В., Назарчук О. А. Використання антисептиків для моделювання дисбіотичних порушень в експерименті // Вісник проблем біології і медицини. №2 (156). 2020. С. 223-226. (\* – проведення бактеріологічних досліджень, направлених на оцінку дисбіотичних станів, підготовка статті).

16. Бобир В. В., Назарчук О. А., Палій Д. В., Яцула О. В. Мікробіологічна, електронно-мікроскопічна оцінка дії Декасану®, Горостену® на бактерії. Львівський медичний часопис. 2017. Том XXIII, № 1-2. С. 24-30. (\* – приготування препаратів для електронно-мікроскопічних досліджень, аналіз результатів).

17. Ширококов В. П., Понятовський В. А., Яворовський О. П., Янковський Д. С., Димент Г. С., Бобир В. В. Вплив гелю бентоніту на фізіологічні показники лабораторних мишей. Медичні перспективи. 2018. Т.23, №4. С. 4-11. Doi. 10.26641/2307-0404.2018.4.152924 (\* – аналіз фізіологічних показників лабораторних тварин після дворічного вживання гелевої форми монтморилоніту бентоніту, написання висновків).

18. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Ширококов В. П., Назарчук О. А. Вплив сорбентів на тривалість виділення ентеровірусів від мишей з дисбіозом *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2017. №28. С. 39-42. (\* – експериментальне дослідження тривалості виділення ентеровірусів у тварин, підготовка матеріалів до друку).

19. Bobyr V. V., Nazarchuk O. A. The role of sorbents and probiotics in the prevention of structural-morphological disorders in mice with dysbiosis on the background of virus-bacterial infection. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020; 10(8):549-558. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.08.067> (\* – проведення експериментальних досліджень, узагальнення та аналіз результатів, написання статті).

20. Вплив кишкової мікрофлори на збереження інфекційності ентеровірусів в експерименті / В. В. Бобир, В. А. Понятовський, О. М. Дюжикова, В. П. Ширококов, О. А. Назарчук, В. Б. Настенко // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2017. №29. 2017. С. 10-15. (\* – літературний пошук, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення).

21. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis / V. V. Bobyr, L. O. Stechenko, V. P. Shyrobokov, O. I. Cryvosheyeva,

O. A. Nazarchuk, V. A. Ponyatovskyi, S. M. Chuhrai. Report of morphology. 2019. №2, Vol.25. P. 78-84. (\* – проведення моделювання дисбіотичних розладів у тварин, аналіз результатів).

22. Аналітичне прогнозування чутливості до аміноглікозидів *Pseudomonas aeruginosa* / О. А. Назарчук, Д. В. Палій, В. І. Нагайчук, Н. І. Осадчук, Е. Кьоніг, В. В. Бобир. Вісник морфології. 2016. Т. 22. №2. С. 222-224. (\* – забір матеріалу, статистична обробка результатів, висновки).

23. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shirobokov V. P., Nazarchuk O. A., Rymsha O. V. The role of sorbents and probiotics in prevention of structural and morphological disorders in the small intestine of animals developing in dysbiosis Reports of Morphology. 2020. №2, Vol. 26. P. 45-50. (\* – моделювання дисбіозу, отримання зрізів для електронної мікроскопії, підготовка матеріалів до друку).

24. Analytic prognostication of sensitivity to fluoroquinolones in *S. aureus*, as pathogens of infectious complications in burn patients / V. L. Nahaichuk, O. A. Nazarchuk, Y. M. Babina, N. I. Osadchuk, V. V. Bobyr, D. V. Dmytriiev, D. V. Palii, Y. F. Makats, R. M. Chornopyshchuk. Reports of Vinnytsia National Medical University. 2020. V. 24(1). P. 25-30. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports - vnmedical-2020-24\(1\)-05](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-05). (\* – визначення чутливості збудників до антибіотиків, прогнозування чутливості).

25. Степаненко В. І., Маркевич К. Г., Бобир В. В., Широбоков В. П. Актуальні питання діагностики, лікування та профілактики генітальної герпетичної інфекції. Науковий вісник НМУ імені О.О. Богомольця. 2007. №4 (15). С. 239-255. (\* – проведення електронно-мікроскопічних досліджень, аналіз результатів).

26. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків / Г. К. Палій, О. А. Назарчук, Бобир В. В., О. О. Гончар, Т. Л. Гридина, Д. В. Палій, І. В. Коваленко, В. М. Буркот. Мікробіологія і біотехнологія. 2015. №4. С. 67-74. (\* – порівняльний аналіз антимікробної активності антисептичних препаратів, оформлення статті).

27. Пат. 45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Широбоков В. П., Бобир В. В., Янковський Д. С., Димент Г. С.; заявник і власник ТОВ «О.Д. Пролісок»; заявл. 02.06.2009; опубл. 26.10.2009, Бюл №20. (\* – отримання гелю бентоніту).

28. Понятовський В. А., Бобир В. В., Широбоков В. П. Очищення стічних вод від ентеровірусів та бактеріофагів на спорудах Бортницької станції аерації. Мікробіологічний журнал. 2014. № 2. С. 53-58 // Мікробіологічний журнал. 2014. № 2. С. 53-58. (\* – літературний пошук, аналіз результатів).

29. Понятовський В. А., Широбоков В. П., Бобир В. В. Використання коліфагів при вірусологічному моніторингу стічних вод. Випуск № 2 з проблем «Вірусологія та мікробіологія». Протокол № 20 від 25.12.2013 р. – інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я. Київ: Укрмедпатентінформ. № 32. 2014. С. 3. (\* – проведення порівняльних вірусологічних досліджень, направлених на індикацію ентеровірусів в стічних водах та клінічному матеріалі).

30. Бобир В. В. Энтеровирусы при дисбиотических нарушениях кишечника. Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и

практического здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского. 2009. Т. 145, часть V. С. 141.

31. Бобир В. В., Понятовський В. А. Дослідження поширеності ентеровірусів у хворих з ВІЛ/СНІД. Міжнародна науково-практична конференція, присвячена Всесвітньому дню здоров'я. 27 квітня 2011р. Український науково-медичний журнал. Спеціальний випуск. 2011. №2. С. 40-41 (\* – дослідження поширення ентеровірусів у хворих на ВІЛ-інфекцію та написання тез).

32. Бобир В. В. Понятовський В. А. Дослідження поширеності вірусів Норфолк у хворих з ВІЛ/СНІД. Міжнародний науково-практичний конгрес студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» 12-14 жовтня 2011 р. Український науково-медичний журнал. Спеціальний випуск 2011. №3. С. 211-212 (\* – визначення антигену вірусів Норфолк методом ІФА та написання тез).

33. Бобир В. В., Понятовський В. А. Ентеровіруси у хворих з ВІЛ/СНІД Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. №1 (04). 2011. Київ, 29-30 березня 2011 р. С. 91-92 (\* – дослідження поширення ентеровірусів у хворих на ВІЛ-інфекцію та написання тез).

34. Понятовський В. А., Бобир В. В. Характеристика генетичних маркерів вірулентності виділених із стічних вод ентеровірусів. Український науково-медичний молодіжний журнал: тез. доп. V (67) Міжнародного науково-практичного конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини», 23-25 жовтня 2013 р. Київ. 2013. № 4 (74). С. 150. (\* – аналіз генетичних маркерів вірулентності та написання тез).

35. Бобир В. В. Особливості структурно-морфологічних змін при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника // Матеріали всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнародною участю “Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології”, присвяченої 90-річчю акад. А. Я. Циганенка, 24-26 червня 2019 р.: тези доп. – Харків, 2019. – С. 55-56.

36. Бобир В. В. Шпак Б. І. Дослідження гетерогенності бактеріофагів за бляшкоутворенням Український науково-практичний молодіжний журнал. 2007. №3. С. 107. (\* – титрування бактеріофагів, вивчення їх властивостей та написання тез).

37. Сравнительная оценка методов детекции энтеровирусов из сточных вод / В. А. Понятовский, В. П. Широбоков, В. В. Бобырь // Материалы Международной научной конференции «Современная профилактическая медицина: от медицины патологий к медицине здоровья», Россия, г. Москва, 25-27 сентября 2013 г. С. 63-73.

38. Бобир В. В. Вживаність вірусів Коксакі В та їх генетичних варіантів в лабораторних умовах «Біоресурси і віруси»: тези 5 міжнародної конференції (10-13 вересня 2007 р.). – Київ: Київський національний університет імені Т.Г. Шевченка, 2007. – С. 122.

39. Бобир В. В. Генетичні маркери вірулентності ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом. Наукова конференція присвячена 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», 5 листопада 2019 р., м. Київ. 2019. С.16-17.

## АНОТАЦІЯ

### **Бобир В.В. Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Державна установа «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського Національної академії медичних наук України», Київ, 2021.

В дисертаційній роботі за результатами параклінічних і експериментальних досліджень здійснено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення важливої наукової проблеми – з'ясування ролі ентеровірусів у структурі порушень кишкового мікробіому, та на основі проведених досліджень науково обґрунтовано нові підходи до корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору.

На підставі вірусологічних та молекулярно-генетичних досліджень фекальних мас здорових осіб та людей з дисбіозом встановлено закономірну присутність в них вірусних агентів (ентеровіруси, норовіруси, бактеріофаги). В експерименті на мишах на прикладі ентеровірусів доведено взаємодію вірому та бактеріального компоненту мікробіому кишківника в умовах дисбіозу, а також сформульовано наукову гіпотезу про спроможність ентеровірусів ініціювати апоптозні процеси в тонкому кишківнику та некротичні зміни генералізованого характеру у печінці.

В процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу обґрунтовано ефективність профілактичного використання ентеросорбентів та встановлено гепатопротекторну властивість сорбенту на основі бентоніту, спрямовану на збереження ультраструктурної організації печінки, що підтверджено електронно-мікроскопічними дослідженнями.

**Ключові слова:** віром, мікробіом, дисбіоз, кишківник, мікробіоценоз, нормобіоценоз, пробіотики, ентеросорбенти.

## ANNOTATION

### **Bobyry V.V. Enteroviruses in structure of disbiotic disorders. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.**

The dissertation on achieving the scientific degree of Doctor of Medicine majoring in 03.00.06 – Virology. – State Institution «Institute of Epidemiology and Infectious Diseases named after L.V. Hromashevsky of the Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, 2021.

In the dissertation based on the results of paraclinical and experimental research a theoretical generalization is made and an important scientific problem – elucidation of the enteroviruses role in the structure of intestinal microbiome disorders – is solved. On the basis of the conducted researches new approaches to correction of the normal intestinal microflora composition taking into account the viral factor are scientifically substantiated.

Based on virological and molecular genetic studies of fecal masses of healthy individuals and people with dysbiosis the regular presence of viral agents (enteroviruses, noroviruses, bacteriophages) was established. In the experiment with mice on the example

of enteroviruses the interaction of virome and bacterial intestinal microbiome in dysbiosis was proved. The scientific hypothesis about the ability of enteroviruses to initiate pronounced apoptotic processes in the small intestine and generalized necrotic changes in the liver was formulated.

In the process of modeling of viral and bacterial infections on the dysbiosis background, the effectiveness of prophylactic use of enterosorbents was substantiated. The pronounced hepatoprotective property of bentonite based sorbent, aimed at preserving the ultrastructural organization of the liver, was established, that was confirmed by electron microscopic studies.

**Keywords:** virome, microbiome, dysbiosis, intestinal, microbiocenosis, normal microflora, normobiocenosis, probiotics, enterosorbents.

## АННОТАЦИЯ

**Бобыр В.В. Энтеровирусы в структуре дисбиотических расстройств. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Государственное учреждение «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского Национальной академии медицинских наук Украины», Киев, 2021

В диссертационной работе по результатам параклинических и экспериментальных исследований осуществлено теоретическое обобщение и достигнуто решение важной научной проблемы – определена роль энтеровирусов в структуре нарушений кишечного микробиома, и на основе проведенных исследований научно обоснованы новые подходы к коррекции состава нормальной микрофлоры кишечника с учетом вирусного фактора.

На основании анализа научной литературы показано, что желудочно-кишечный тракт является одним из самых сложных микробных экосистем человека, детальное изучение которых способно открыть новые перспективы лечения инфекционных заболеваний. Расширение представлений об особенностях влияния микробиома на вирусные заболевания может инициировать внедрение новых эффективных противовирусных стратегий.

Вирусологическими и молекулярно-генетическими исследованиями 740 образцов клинического материала (фекальных масс) здоровых лиц и людей с дисбиозом установлено закономерное присутствие у них вирусных агентов (энтеровирусы, норовирусы, бактериофаги) и доказано увеличение частоты выделения энтеровирусов при дисбиотических расстройствах почти в 3 раза (8,9% у лиц с дисбиозом и 3,3% в контрольной группе) ( $p \leq 0,05$ ). Энтеровирусы при дисбиозах представлены полиовирусами (61%), вирусами Коксаки В (18%), вирусами ЕСНО (8%), а также нетипированными штаммами (13%).

Показан рост частоты регистрации вируса Норфолк у детей с дисбиотическими расстройствами, в отличие от лиц с ненарушенной микробиотой кишечника, и изучен вопрос присутствия F-специфических колифагов в образцах фекалий, полученных от людей, в том числе и с дисбиотическими расстройствами.

Установлено, что частота выделения F-специфических колифагов в образцах фекалий людей не превышает 3,62-4,8%, независимо от наличия дисбиотических нарушений.

Предложены эффективные методические подходы для изучения вирусных изолятов, выделенных при дисбиозе. В частности, обоснована целесообразность использования комбинации наиболее чувствительных клеточных культур для изоляции фекальных масс и видовой идентификации энтеровирусов от лиц с дисбиотическими расстройствами. Разработаны оригинальные способы эффективной электронно-микроскопической верификации энтеровирусов при исследовании вирусосодержащего материала с низким титром ( $-\log \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  ниже  $10^6$ ), что позволило охарактеризовать морфологию нетипированных штаммов энтеровирусов.

Создана и экспериментально обоснована модель формирования дисбиоза у мышей путем использования комбинации антибиотиков ампициллина и метронидазола, а также доказана эффективность применения антисептика декаметоксина для потенцирования действия антибиотиков в процессе моделирования таких процессов.

Сформулировано научную гипотезу о способности энтеровирусов инициировать апоптозные процессы в тонком кишечнике и некротические изменения генерализированного характера в печени.

Установлена способность монопробиотических препаратов на основе бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий, а также мультипробиотиков на основе *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Acetobacter* сокращать продолжительность выделения вируса полиомиелита у животных с ненарушенным микробиоценозом кишечника в эксперименте. С использованием модели антибиотик-индуцированного дисбиоза на ультраструктурном уровне доказана способность мультипробиотиков на основе *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Acetobacter* способствовать уменьшению цитодеструктивных изменений в слизистой тонкого кишечника мышей, нормализовать морфоиммуногенез, а у мышей с дисбиозом, инфицированных Коксаки В3, способствовать редукции инициированных вирусами апоптозных процессов в тонком кишечнике.

В процессе моделирования вирусно-бактериальных инфекций на фоне дисбиоза обоснована эффективность профилактического использования энтеросорбентов и установлено выраженное гепатопротекторное свойство сорбентов на основе монтмориллонита (бентонита), направленное на сохранение ультраструктурной организации печени, что подтверждено электронно-микроскопическими исследованиями.

**Ключевые слова:** вирус, микробиом, дисбиоз, кишечник, микробиоценоз, нормобиоценоз, пробиотики, энтеросорбенты.



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

<b>A<sub>бент</sub><sup>+</sup></b>	– генетичний маркер ентеровірусів з високим афінітетом до бентоніту
<b>A<sub>бент</sub><sup>-</sup></b>	– генетичний маркер ентеровірусів з низьким афінітетом до бентоніту
<b>ВП</b>	– вірус поліомієліту
<b>ВООЗ</b>	– Всесвітня організація охорони здоров'я
<b>ГКІ</b>	– гострі кишкові інфекції
<b>ГГМКК</b>	– гідрогельметилкремнієва кислота
<b>ДКМ</b>	– декаметоксин
<b>ДНК</b>	– дезоксирибонуклеїнова кислота
<b>ЕМ</b>	– електронна мікроскопія
<b>ЕВЛ</b>	– ентеровіруси людини
<b>ЗТ – ПЛР</b>	– полімеразно-ланцюгова реакція з етапом зворотної транскрипції
<b>КУО</b>	– колонієутворююча одиниця
<b>МІК</b>	– мінімальна інгібуюча концентрація
<b>МБсК</b>	– мінімальна бактеріостатична концентрація
<b>МБцК</b>	– мінімальна бактерицидна концентрація
<b>ОКС</b>	– оцтовокислий свинець
<b>ПЛР</b>	– полімеразно-ланцюгова реакція
<b>РВН</b>	– реакція віруснейтралізації
<b>РНК</b>	– рибонуклеїнова кислота
<b>ТЦД<sub>50</sub></b>	– така доза вірусів, що спричиняє цитопатогенний ефект в 50% моношарів інфікованих вірусом клітин
<b>ФВК</b>	– фосфорно-вольфрамова кислота
<b>ФМК</b>	– фосфорно-молібденова кислота
<b>ХТЗ</b>	– хіміотерапевтичні засоби
<b>ЦПД</b>	– цитопатогенна дія
<b>ЦПЕ</b>	– цитопатогенний ефект
<b>ЦПА</b>	– цитопатогенний агент
<b>ПЕГ</b>	– поліетиленгліколь
<b>ШКТ</b>	– шлунково-кишковий тракт