

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА
ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ім. Л. В. ГРОМАШЕВСЬКОГО

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОБИР ВІТАЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ

УДК:578.835.1:616.34-008.87-008.6

ДИСЕРТАЦІЯ
ЕНТЕРОВІРУСИ В СТРУКТУРІ ДИСБІОТИЧНИХ РОЗЛАДІВ
(експериментально-параклінічні дослідження)

03.00.06 – вірусологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають
посилання на відповідне джерело

_____ В.В. Бобир

Науковий консультант: **Широбоков Володимир Павлович**, академік НАН та
НАМН України, заслужений діяч науки і техніки
України, доктор медичних наук, професор.

Київ-2021

АНОТАЦІЯ

Бобир В.В. Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.06 – “Вірусологія” (22 – охорона здоров’я). – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України. Київ, 2020; ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського» НАМН України.

Дисертація присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми – з’ясування ролі ентеровірусів у структурі порушень кишкового біоценозу та науковому обґрунтуванню шляхів корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з урахуванням вірусного фактору.

На підставі аналізу наукової літератури показано, що шлунково-кишковий тракт є однією з найскладніших мікробних екосистем людини, детальне вивчення яких може відкрити нові перспективи лікування інфекційних та соматичних захворювань. Розширення уявлень про особливості взаємодії бактеріального компоненту мікробіому та вірому, а також впливу мікробіому на вірусні захворювання може ініціювати впровадження нових ефективних противірусних стратегій.

З метою виявлення цитопатогенних агентів в осіб з дисбіотичними порушеннями матеріал тестували на культурах клітин та проводили видову ідентифікацію виявлених агентів в реакції віруснейтралізації і полімеразній ланцюговій реакції із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Наявність інших кишкових вірусів, зокрема вірусів Норфолку у людей з дисбіотичними порушеннями визначали шляхом постановки імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням тест-систем RIDASCREEN Norwalk-like Virus, яка передбачає виявлення антигену вірусу Норфолк у випорожненнях хворих. Отримані результати аналізували також з позиції первинного діагнозу, з яким звертались пацієнти до медичного закладу та порівнювали зі звітними даними

наглядних органів (ЦГЗ) і результатами виділення ентеровірусів з об'єктів навколишнього середовища.

Для порівняння ефективності виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу зразки тестували у культурах клітин RD, HEp-2, Vero, HeLa, L20B та L41. Аналіз ступеню вірулентності ентеровірусних ізолятів проводили з використанням генетичних маркерів вірулентності: rct40, бентонітового маркеру та маркеру S. Для вивчення тривалості збереження інфекційності клінічних ізолятів їх витримували при температурі +4°C, +20°C, +37°C, відбираючи зразки на 3, 10, 18, 36, 60 та 90 добу з подальшим титруванням.

Порівняння ефективності формування дисбіозу кишківника у лабораторних тварин проводили з використанням антибіотиків гентаміцину, тетрацикліну, канаміцину, ампіциліну, метронідазолу та антисептиків на основі декаметоксину. Моделювання ентеровірусних інфекцій проводилось на 30-денних білих мишах лінії Balb/c.

В якості пробіотичних мікроорганізмів у дослідженнях, спрямованих на визначення вірусно-бактеріальної взаємодії, використали *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Esherichia coli* а також пробіотичні штами мікроорганізмів в складі мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter*. Дослідження антимікробних властивостей вірусних сорбентів, їх вплив на фізіологічні показники та тривалість виділення ентеровірусів у лабораторних мишей відбувалось з використанням таких сорбентів як гідрогель метилкремнієвої кислоти та гелева форма бентоніту з контрольованим катіонним заміщенням.

Додатково, із залученням електронно-мікроскопічних та гістологічних методик, досліджено особливості структурно-морфологічних змін при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника у мишей та роль пробіотиків і сорбентів в профілактиці таких порушень.

В результаті вивчення закономірностей поширеності цитопатогенних агентів (ЦПА) у різних груп людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами, показано, що частота їх реєстрації в осіб з дисбіозом обернено пропорційна

ступеню дисбіотичних порушень. Встановлено зростання частоти виділення ентеровірусів у осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника (з 386 досліджених зразків виділено 34 ізоляти ентеровірусів, з них поліовірусів – 24, вірусів Коксакі В – 7, вірусів ЕСНО – 3, виявились нетипованими – 5 штамів) в порівнянні з особами, в яких бактеріологічно не підтверджено порушень мікробіоценозу кишківника (з 354 досліджених зразків виділено 12 штамів ентеровірусів, серед них нетиповані ентеровіруси (6 штамів), поліовіруси (група С) (4 штами) та віруси Коксакі В (група В) (2 штами).

Поліовіруси найчастіше реєстрували серед пацієнтів вікової категорії 1-2, 6-7 р. та 14-15 років, віруси Коксакі – у вікових категоріях 1-2 та 3-5 років. Віруси ЕСНО частіше виділяли від дорослих, а нетиповані ізоляти визначали практично у всіх досліджуваних вікових групах. Встановлено також присутність ентеровірусів у здорових осіб: з 354 досліджених таких зразків – ентеровіруси виділено у 6 випадках. У хворих на ВІЛ-інфекцію не спостерігали зростання частоти реєстрації ентеровірусів.

Для швидкого виділення та ідентифікації ентеровірусів з фекальних мас, обґрунтовано доцільність використання комбінації декількох клітинних культур, зокрема, L20В та НЕр-2. Досліджено поширеність вірусів Норфолк у різних категорій осіб, в тому числі і осіб з дисбіотичними порушеннями. У хворих на ВІЛ-інфекцію встановлено відсутність зростання частоти присутності вірусів Норфолк. Разом з тим, підтверджено зростання частоти реєстрації вірусів Норфолк в осіб з дисбіотичними розладами: із 30 досліджених зразків, антигени вірусу Норфолк виявлено у семи випадках. Вперше вивчено питання присутності F-специфічних колифагів у зразках фекалій, отриманих від людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами. Встановлено, що частота виділення бактеріофагів від людей в цілому є низькою (3,62 – 4,8%) і не залежить від ступеню дисбіотичних порушень.

Порівняльними дослідженнями визначено оптимальні методичні підходи до концентрування ентеровірусів та підготовки препаратів для

електронно-мікроскопічної верифікації, що дозволило значно ефективніше дослідити структурно-морфологічні особливості вірусів. Розроблено ефективний спосіб електронно-мікроскопічної верифікації вірусних часточок при дослідженні вірусомісного матеріалу з низьким титром ($\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ нижче 10^6).

Використовуючи сучасні підходи до аналізу структурно-морфологічних особливостей вірусів, порівняльно вивчено 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.

Аналіз частоти реєстрації генетичних маркерів вірулентності (rct_{40} , маркер $A_{\text{бент}}$, маркер S) у поліовірусів дозволив віднести усі отримані ізоляти до авірулентних (вакцинних) штамів та показав, що за досліджуваними ознаками диференціювати штами, отримані від осіб з дисбіотичним розладами та від осіб з відсутністю порушень з боку кишкового мікробіоценозу, неможливо. Зафіксовано зростання частоти реєстрації усіх маркерів вірулентності у клінічних ізолятів вірусів Коксакі В та нетипованих ентеровірусів, виділених при дисбіотичних станах, в порівнянні з штамами, отриманими від осіб з відсутністю дисбіотичних порушень.

Окреслено фенотипові характеристики неполіомієлітних ентеровірусів, отриманих від осіб з дисбіозом: низький афінитет до бентоніту (маркер $A_{\text{бент}}$), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (позитивний маркер S) та у більшості випадків позитивний маркер rct_{40} , що дає підстави рекомендувати їх визначення для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями. Зростання частоти реєстрації маркерів вірулентності в ізолятів вірусів Коксакі В та ЕСНО дозволяє також зробити припущення про їх роль у структурі дисбіотичних порушень.

Результати досліджень демонструють підвищену резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В при довготривалому зберіганні при різних температурних режимах у порівнянні з лабораторними штамми, а також демонструють зниження стійкості клінічних ізолятів вірусів Коксакі В при їх тривалому пасажуванні у культурах клітин. Аналіз тривалості збереження інфекційності у ізолятів вірусів Коксакі В та нетипованих штамів, виділених від осіб з дисбіозом та осіб з непорушеною мікрофлорою при різних температурних режимах, показав їх диференціацію за вказаними властивостями. Зокрема, при температурі +20 та +37°C тривалість збереження інфекційної активності ізолятів від осіб з дисбіозом зростала майже вдвічі, у порівнянні з штамми, отриманими від людей з непорушеною мікрофлорою кишківника.

Порівняльно вивчено ефективність використання різних груп антибактеріальних препаратів для формування дисбіотичних порушень у тварин та розроблено ефективну модель дисбіозу у мишей шляхом використання комбінації ампіциліну і метронідазолу. Доведено ефективність застосування декаметоксину для потенціювання дії антибіотиків в процесі моделювання дисбіотичних станів

Досліджено вплив дисбіотичних розладів на захворюваність та летальність мишей, інфікованих вірусом Коксакі В і поліовірусами 2 типу та вперше показано відсутність статистично достовірної різниці за цими показниками у групах мишей з дисбіотичними розладами і тварин зі збереженою мікрофлорою. Крім того, встановлено, що формування дисбіотичних порушень у тварин призводить до скорочення часу звільнення їх організму від ентеровірусів.

Доведено властивість живих монопробіотичних препаратів на основі *L. plantarum*, *L. fermentum*, *B. bifidum*, *E. coli*, а також мультипробіотиків на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* скорочувати тривалість виділення вірусів вакцинного штаму вірусу

поліомієліту 2 типу поліомієліту у тварин з не порушеним мікробіоценозом кишківника з 14 до 8 діб ($P \leq 0,05$).

Вдосконалено спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей, що забезпечує підвищення його сорбційних властивостей, в тому числі і для ентеровірусів, вологоутримуючу здатність, а також ступінь очищення та диспергування. На основі порівняльного дослідження антимікробних і сорбційних властивостей кремійвмісних сорбентів на основі монтморилоніту бентоніту та гідрогелю метилкремнієвої кислоти вперше показано їх здатність зв'язувати бактерії. В більшій мірі такі властивості виражені у гідрогелю метилкремнієвої кислоти, який, в залежності від виду мікроорганізмів, здатний сорбувати від 52 до 90 % клітин.

Досліджено вплив сорбентів на деякі фізіологічні показники тварин. Зокрема, вперше показано позитивну дію гелевої форми бентоніту на організм білих лабораторних мишей (лінія BALB/c), що супроводжується вираженим зниженням їх летальності та стимуляцією фертильних функцій.

Зафіксовано зниження тривалості виділення вірусів поліомієліту 1 типу (вакцинних штамів) у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом після перорального вживання ентросорбенту на основі гелевої форми бентоніту та, в меншій мірі, гідрогелю метилкремнієвої кислоти. Так, тварини контрольної групи (тварини з антибіотикоіндукованим дисбіозом кишківника) виділяли вірус поліомієліту протягом 8 діб (титр вірусу на восьму добу становив $1,0 \pm 0,25$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 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 $1,25 \pm 0,12$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл), $P \leq 0,05$, а тварин, які отримували ГГМКК - 6 діб (на шосту добу титр вірусів становив $1,0 \pm 0,21$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл), $P \leq 0,05$. Встановлено властивість монтморилоніту бентоніту сприяти зниженню інфекційної активності вірусів у тварин з порушенням складу мікробіоти кишківника при його використанні в комбінації з антибактеріальними препаратами.

Експериментально обґрунтовано можливість антибактеріальних препаратів формувати у тварин дисбіотичні порушення, які супроводжуються вираженими цитодеструктивними змінами в епітелії тонкого кишківника, а саме вкороченням та десквамацією мікрворсинок, набряком мітохондрій, просвітленням матриксу цитоплазми, порушенням зв'язку між епітеліальними клітинами та розвитком апоптозу. Доведено стимулюючий вплив дисбіозу на активізацію імунних захисних реакцій.

Показано здатність дисбіотичних станів поглиблювати перебіг експериментальних вірусно-бактеріальних інфекцій у тварин, що в першу чергу проявляється збільшенням падіжу та зростанням частоти проявів хвороби. Крім того, моделювання таких інфекцій на тлі порушення складу нормальної мікрофлори кишківника дозволило зафіксувати посилення дегенеративних змін у внутрішніх органах тварин, зокрема у печінці, які можуть набувати генералізації і супроводжуватись активацією імунокомпетентних клітин.

Експериментально, з використанням лабораторних тварин, доведено можливість пробіотичних препаратів та ентеросорбентів сприяти зменшенню глибини цитодеструктивних порушень при формуванні антибіотикоіндукованого дисбіозу, а також нормалізації імунних реакцій організму, які супроводжують розвиток таких станів.

Ключові слова: дисбіоз, віром, кишківник, мікробіоценоз, нормальна мікрофлора, пробіотики, сорбенти.

ABSTRACT

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 (22 – Health care). – Bogomolets National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Kyiv 2020.

The dissertation is dedicated to the solution of such topical scientific problem as clarification of the role of enteroviruses in the structure of intestinal biocenosis disorders and scientific substantiation of the normal intestinal microflora composition correction taking into account the viral factor.

Based on the study and analysis of the scientific literature it was shown that the human gastrointestinal tract is an environment for one of the most complex microbial ecosystems, detailed study of which can open new perspectives for therapy of infectious diseases. Understanding of microbiome influence on viral diseases can initiate introduction of new effective antivirus strategies.

Criteria for the diagnosis of dysbiosis were the detection of bifidobacteria in the amount of $<10^8$ CFU/g feces, “lactose-negative” strains of *Escherichia coli* or *Escherichia coli* with reduced enzymatic activity in the amount of $>10^6$ CFU/g feces, the appearance of hemolytic forms of bacteria that should be absent in healthy people, detection of conditionally pathogenic gram-negative rods (*Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacteria*, etc.) in the amount of $>10^4$ CFU/g feces, detection of yeast-like fungus of the genus *Candida* more than 10^3 in 1 g, the presence of *S. aureus*, increase ($>10^8$ CFU/g) or reduction ($<10^6$ CFU/g) the number of *E. coli*.

All samples were tested on cell cultures with further species identification in the virus neutralization reaction and in RT-PCR to detect cytopathogenic agents in individuals with dysbiotic disorders. The prevalence of other intestinal viruses, including Norfolk viruses in people with dysbiotic disorders, was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using RIDASCREEN Norwalk-like Virus test systems, which detect the antigen of Norfolk virus in the feces of patients. The results were also analyzed from the standpoint of the initial diagnosis, with which patients applied to the medical institution and compared with the reported data of the Central SES of the Ministry of Health of Ukraine and the results of isolation of enteroviruses from the environment.

Samples were tested in the following cell lines RD, HEp-2, Vero; HeLa; L20B and L41 to study the efficiency of enteroviruses isolation from clinical material.

Analysis of the virulence degree of isolates was performed using such genetic markers of virulence as marker rct40, bentonite marker and marker S; to clarify the duration of clinical isolates infectivity persistence they were kept at a temperature of + 4 ° C, + 20 ° C, + 37 ° C, selected on 3, 10, 18, 36, 60 and 90 days from the beginning of the experiment and titrated by cytopathic action using micromethod, comparing with museum prototype strains of enteroviruses: Coxsackie B3 (strain Nancy) and Coxsackie B6 (strain Hammon).

The study of the effectiveness of intestinal dysbiosis formation in laboratory animals was performed using antibiotics such as gentamicin, tetracycline, kanamycin; ampicillin, metronidazole and antiseptics Dekasan® and Gorosten®. Enterovirus infections were simulated in 30-day-old Balb/c white mice that had been pre-acclimatized in the laboratory by infection with Coxsackie B3 virus and poliovirus serotype 2 vaccine.

In studies aimed at determining the viral-bacterial *interaction Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Esherichia coli* were used as probiotic microorganisms as well as combined forms, for example, the multiprobiotic. The research of antimicrobial properties of viral sorbents, their effect on physiological parameters and the duration of enterovirus selection in laboratory mice was performed using such sorbents methyl silicic acid hydrogel, bentonite gel with controlled cationic substitution.

In addition, with the involvement of electron microscopic and histological methods the features of structural and morphological changes in experimental antibiotic-induced intestinal dysbiosis were studied as well as the role of probiotics and sorbents in the prevention of such disorders.

As a result of studying the patterns of cytopathogenic agents and enteroviruses distribution in different categories of people, including those with dysbiotic disorders, it is shown that the frequency of CPA registration in the material from people with dysbiosis is directly proportional to the degree of dysbiotic disorders. An increase in the enteroviruses selection frequency in individuals with disorders of the normal intestinal microflora composition was established(out of 386 studied

samples, 34 strains of enteroviruses were isolated, including 24 polioviruses, 7 Coxsackie B viruses, 3 ECHO viruses, and 5 strains were atypical). It has been shown that polioviruses were most often registered in the age categories 1-2, 6-7 and 14-15 years, Coxsackie viruses were prevail in the age categories 1-2 and 3-5 years, ECHO viruses were more often isolated from adults, and atypical ones were found almost in all studied age groups. The possibility of healthy individuals allocate enteroviruses was also established: out of 354 samples from healthy individuals, enteroviruses were isolated in 6 cases. At the same time, there is no increase in the frequency of enterovirus registration in people with HIV.

For rapid isolation and identification of enteroviruses from fecal masses it is advisable to use a combination of several cell cultures, in particular L20B, which are well to cultivation of polio viruses and HEp-2, which show the highest sensitivity when other types of enteroviruses are isolating.

The prevalence of Norfolk viruses in different categories of people, including people with dysbiotic disorders, was explored. It is established that there is no increase in the presence frequency of Norfolk virus antigen in people with HIV. However, the increase in the registration frequency of Norfolk viruses in individuals with dysbiotic disorders was confirmed - the presence of Norfolk virus antigens was detected in 7 of the 30 studied samples. It is concluded that there is a need for in-depth study of the norovirus infection spread in our country, especially among children. The presence of F-specific coliphages in faecal samples obtained from humans, including those with dysbiotic disorders, was studied for the first time. It is shown that the frequency of bacteriophage excretion from humans is generally low (from 3.62% to 4.8%) and does not depend on the degree of dysbiotic disorders.

Comparative studies have determined the optimal methodological approaches to the concentration of enteroviruses and preparation of slides for electron microscopic verification, which allowed to study the structural and morphological features of viral agents more effectively. An effective method of electron microscopic verification of viral particles in the research of virus-containing material with a low titer ($\text{TCD}_{50}/\text{ml}$ below $10^{6.0}$) has been developed.

The morphology of enteroviruses atypical strains isolated from different categories of individuals, including individuals with dysbiotic disorders, has been comparatively studied using modern approaches to the analysis of structural and morphological features. The conformity of the size, structure of the virion and some properties of atypical strains with structure and properties of enteroviruses in particular laboratory prototype strains is proved.

Analysis of the virulence genetic markers (rct^{40} , marker A_{bent} , marker S) registration frequency in polioviruses allowed to attribute all obtained isolates to avirulent (vaccine) strains and showed that it is impossible to differentiate strains obtained from persons with dysbiotic disorders and from persons with normal intestinal microflora composition on studied signs.

However, there was an increase in the registration frequency of all virulence markers in clinical isolates of Coxsackie B virus and atypical enteroviruses allocated in dysbiotic conditions, compared with strains obtained from individuals without dysbiotic disorders.

The phenotypic characteristics of non-poliomyelitis enteroviruses obtained from individuals with dysbiosis are outlined, for example low affinity for bentonite (A_{bent}^- marker), formation of small plaques under bentonite coating (S + marker) and in most cases positive rct^{40} marker, that gives grounds to recommend their identification for intraphylum differentiation of enteroviruses that are isolated from persons with dysbiotic disorders. The increase in registration frequency of virulence markers in isolates of Coxsackie B and ECHO viruses allow to suggest their possible role in the structure of dysbiotic disorders.

The results of the research show the increased resistance of clinical isolates of Coxsackie B virus compared to laboratory strains, and demonstrate the decrease resistance of clinical isolates of Coxsackie B virus during long cell culture passages. Analysis of infectivity maintenance duration in isolates of Coxsackie B virus and atypical strains isolated from different groups of individuals in different temperatures, revealed their differentiation by these properties. In particular, at a temperature of +20 and + 37°C the infectivity maintenance duration of isolates from

persons with dysbiosis almost doubled, compared with strains obtained from people with intact intestinal microflora.

The comparative study directed at possibility of different antibacterial drugs groups using for the formation of dysbiotic disorders in animals was performed and an effective model of dysbiosis by using a combination of ampicillin and metronidazole in mice has been developed. The effectiveness of decamethoxine for potentiating the antibiotics action in the process of modeling dysbiotic conditions has been proven.

The dysbiotic disorders influence on the morbidity and mortality of mice infected with Coxsackie B virus and polioviruses type 2 was studied, the absence of statistically significant difference in these parameters in groups of mice with dysbiotic disorders and animals with preserved microflora was shown. However, it was found that the formation of dysbiotic disorders in animals reduces the time of enteroviruses release of their bodies.

The property of live monoprotobiotics based on *L. plantarum*, *L. fermentum*, *B. bifidum*, *E. coli*, as well as multiprotobiotic to reduce the duration of poliovirus isolation in animals with intact intestinal microbiocenosis was revealed. At the same time, an increase in in vitro survival time of enteroviruses under conditions of presence in the environment of some species of bacterial microorganisms is shown.

The method of obtaining bentonite gel for medical purposes has been improved, which will increase its sorption properties, including for enteroviruses, moisture retention capacity, as well as the degree of purification and dispersion. The antimicrobial and sorption properties of methyl silicic acid hydrogel and bentonite gel have been studied, their ability to bind bacteria during prolonged contact was shown. Such properties are mostly expressed in methyl silicic acid hydrogel which can sorb from 52 to 90% of cells depending on the type of microorganisms.

The sorbents influence on some physiological parameters of animals has been studied. In particular, it is shown that the use of the gel form of bentonite as a feed additive has a positive effect on laboratory animals (white mice line BALB/c) which is expressed in a significant reduction in mortality and a positive effect on fertility.

There was a decrease in the duration of polioviruses release in animals with antibiotic-induced dysbiosis after oral administration of sorbents bentonite gel and, to a lesser extent, methyl silicic acid hydrogel, the ability of bentonite gel in combination with antibacterial drugs to reduce infectious activity of viruses was experimentally substantiated.

The ability of antibacterial drugs to form dysbiotic disorders in animals, which are accompanied by cytodestructive changes in the epithelium of the small intestine, such as shortening and desquamation of microvilli, edema of mitochondria, enlightenment of cytoplasm matrix, connection disruption between epithelial cells and the development of apoptosis, as well as the dysbiosis stimulating effect on the activation of immune defense responses was experimentally justified.

It has been shown that dysbiotic conditions are able to aggravate the course of viral and bacterial infections in animals, which is primarily manifested by an increase in death and incidence.

In addition, modeling of such infections in the background of normal intestinal microflora disruption allowed to record the strengthening of degenerative changes in the internal organs of animals, in particular in the liver, which may become generalized and accompanied by activation of immunocompetent cells.

The possibility of probiotic drugs and, to a lesser extent, sorbents to reduce the depth of cytodestructive disorders in the antibiotic-induced dysbiosis formation and to normalize immune responses that accompany the development of such conditions have been experimentally proven using laboratory animals.

Keywords: dysbiosis, virome, normal microflora, intestinal, microbiocenosis, probiotics, sorbents.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**(* – особистий внесок здобувача)**

1. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Широбоков В. П. Кишковий віром та нормальна мікрофлора: особливості взаємодії. Аналіз 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 Коксаки 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., Широбоков 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., Широбоков 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. Широбоков, 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. Ponyatovski. *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. Широбоков, 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., Широбоков В. П., Бобир В. В. Порівняльна чутливість перещеплюваних 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. Poniatovskiy, 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., Широбоков 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., Широбоков 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. Широбоков 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., Широбоков 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. Широбоков, 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. Pomyatovskyi, 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., Shyrobokov 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. Палий, О. А. Назарчук, Бобир В. В., О. О. Гончар, Т. Л. Гридина, Д. В. Палий, 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 / Ширококов 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., Ширококов 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., Ширококов 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. Ентеровіруси при дисбіотичних порушеннях кишківника. 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. Ширококов, 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.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. (За редакцією В.П.Ширококова). Вінниця: «Нова Книга», 2020. Підписана до друку 12.12.20. (*–написання розділу «Віром людини»).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	22
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	27
ВСТУП	29
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ПРОБЛЕМУ ДИСБІОТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ ТА РОЛЬ ВІРУСНОГО ФАКТОРУ У ЦЬОМУ ПРОЦЕСІ (огляд літератури)	39
1.1 Дисбіоз як проблема цивілізації: причини виникнення та шляхи вирішення	39
1.2 Людський віром – як компонент мікробіому: сучасний стан вивчення	58
1.3 Особливості взаємодії вірому з іншими представниками мікрофлори людини	67
1.4 Нові підходи до моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин	77
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	83
2.1 Матеріали	83
2.1.1 Культури клітин	83
2.1.2 Віруси	84
2.1.3 Експериментальні тварини	85
2.2 Методи	86
2.2.2 Культивування культур клітин	86
2.2.3 Підготовка матеріалу для вірусологічних досліджень	86
2.2.4 Виділення вірусів у культурі клітин	87
2.2.5 Культивування ентеровірусів у новонароджених мишах	88
2.2.6 Одержання гелю бентоніту	88
2.2.7 Дослідження маркерів вірулентності	90

2.2.7.1	Визначення бентонітового маркеру	90
2.2.7.2	Визначення маркеру gct ₄₀	90
2.2.7.3	Визначення розміру вірусних бляшок під бентонітовим покриттям (S-маркер)	91
2.2.8	Проведення дослідження на дисбіоз та оцінка результатів	91
2.2.9	Виділення бактеріофагів	93
2.2.10	Постановка імуноферментного аналізу	93
2.2.11	Титрування та типування ентеровірусів	94
2.2.12	Концентрування вірусів для електронно-мікроскопічних досліджень	97
2.2.12.1	Концентрування ентеровірусів поліетиленгліколем (ПЕГ) в присутності хлористого натрію	97
2.2.12.2	Концентрування ентеровірусів бентонітом	97
2.2.12.3	Концентрування ентеровірусів ультрацентрифугуванням	98
2.2.12.4	Концентрування з використанням гідрогельметилкремнієвої кислоти (ГГМКК)	98
2.2.12.5	Концентрування з використанням двофазного розділення	99
2.2.13	Електронно - мікроскопічні методи дослідження	100
2.2.14	Генетичні методи дослідження	101
2.2.14.1	Виділення РНК	101
2.2.14.2	Зворотна транскрипція	102
2.2.14.3	Полімеразна ланцюгова реакція	102
2.2.14.4	Електрофоретичний аналіз	102
2.2.15	Моделювання дисбіозу на лабораторних тваринах	103
2.2.16	Приготування поживних середовищ та суспензій мікроорганізмів	103
2.2.17	Визначення антимікробних та сорбційних властивостей сорбентів	103
2.2.18	Методи статистичної обробки отриманих результатів	104

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ПОШИРЕНOSTІ ЕНТЕРОВІРУСІВ, ВІРУСІВ НОРФОЛК ТА КИШКОВИХ ФАГІВ У ОСІБ З ДИСБІОЗОМ	107
3.1 Визначення присутності цитопатогенних агентів у зразках, отриманих від різних категорій осіб	107
3.2 Видова ідентифікація цитопатогенних агентів з клінічного матеріалу від різних категорій осіб	117
3.3 Поширеність колифагів у матеріалі від осіб з дисбіотичними порушеннями кишківника	129
3.4 Поширеність вірусів Норфолк в осіб з кишковим дисбіозом	134
РОЗДІЛ 4. ГЕНОТИПОВІ ТА ФЕНОТИПОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІД ОСІБ З ДИСБІОЗАМИ	139
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЯЦІЇ ТА ЕЛЕКТРОННО- МІКРОСКОПІЧНОЇ ВЕРИФІКАЦІЇ ЕНТЕРОВІРУСІВ ВІД ОСІБ З КИШКОВИМ ДИСБІОЗОМ	160
5.1 Вибір культур клітин для виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу	160
5.2 Порівняльна оцінка методів концентрування ентеровірусів для проведення електронно-мікроскопічної верифікації	168
5.3 Електронно-мікроскопічна верифікація клінічних ізолятів ентеровірусів від осіб з дисбіозом	177
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДИСБІОТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ НА РОЗВИТОК ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У МИШЕЙ	183
6.1 Порівняльна оцінка способів моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин	183
6.2 Моделювання ентеровірусних інфекцій у мишей з дисбіозом	196
6.3 Дослідження впливу бактеріальної мікрофлори на тривалість виділення ентеровірусів мишами	198

6.4 Вплив кишкової мікрофлори на збереження інфекційності ентеровірусів в експерименті	202
РОЗДІЛ 7. СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРИ ДИСБІОЗІ КИШКІВНИКА ТА ВПЛИВ ВІРУСІВ НА ЦЕЙ ПРОЦЕС	212
7.1 Особливості структурно-морфологічних змін при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника	212
7.2 Дослідження структурно-морфологічних змін у внутрішніх органах тварин при вірусних та вірусно-бактеріальних процесах, що розвиваються на фоні антибіотикоіндукованого дисбіозу	220
РОЗДІЛ 8. НАУКОВЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ СОРБЕНТІВ ДЛЯ РЕГУЛЯЦІЇ МІКРОБІОТИ КИШКІВНИКА	234
8.1 Дослідження впливу сорбентів на тривалість виділення ентеровірусів у мишей	235
8.2 Дослідження антимікробних властивостей сорбентів та їх впливу на деякі фізіологічні показники лабораторних мишей	239
8.3 Дослідження впливу сорбентів на деякі фізіологічні показники лабораторних мишей	249
РОЗДІЛ 9. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ ПРОБІОТИКІВ ТА СОРБЕНТІВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ПРИ ДИСБІОЗІ КИШКІВНИКА	255
9.1 Використання пробіотиків та сорбентів для профілактики структурно-морфологічних порушень в кишківнику тварин з дисбіозом	255
9.2 Роль сорбентів та пробіотиків у профілактиці структурно-морфологічних порушень у мишей з дисбіозом, інфікованих ентеровірусами та сальмонелами	265
РОЗДІЛ 10. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	279

	26
ВИСНОВКИ	305
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	308
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	309
ДОДАТКИ	350

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- A_{бент}⁺** – генетичний маркер ентеровірусів з високим афінитетом до бентоніту
- A_{бент}⁻** – генетичний маркер ентеровірусів з низьким афінитетом до бентоніту
- ВП** – вірус поліомієліту
- ВООЗ** – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ВУП** – вакуумний універсальний пост
- ВРХ** – велика рогата худоба
- ГЛА** – гідролізат лактальбуміну
- ГКІ** – гострі кишкові інфекції
- ГРХ** – газорідина хроматографія
- ГГМКК** – гідрогельметилкремнієва кислота
- ГПМК** – гострі порушення мозкового кровообігу
- ДКМ** – декаметоксин
- ДНК** – дезоксирибонуклеїнова кислота
- ЕВ** – ентеровіруси
- ЕМ** – електронна мікроскопія
- ЕВЛ** – ентеровіруси людини
- ЗХК** – запальні хвороби кишківника
- ЗТ – ПЛР** – полімеразно-ланцюгова реакція з етапом зворотної транскрипції
- ІХС** – ішемічна хвороба серця
- КУО** – колонієутворююча одиниця
- МОЗ** – Міністерство охорони здоров'я
- МОН** – Міністерство освіти і науки
- МК** – мінімальна інгібуюча концентрація
- МПА** – м'ясо-пептонний агар
- МПБ** – м'ясо-пептонний бульйон
- МБсК** – мінімальна бактеріостатична концентрація
- МБцК** – мінімальна бактерицидна концентрація
- МКА** – моноклональні антитіла
- ОКС** – оцтовокислий свинець

ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція

РВН – реакція віруснейтралізації

РІТ – редукція інфекційного титру

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТЦД₅₀ – така доза вірусів, що спричиняє цитопатогенний ефект в 50%
моношарів інфікованих вірусом клітин

УА – уранілацетат

ФВК – фосфорно-вольфрамова кислота

ФМК – фосфорно-молібденова кислота

ХТЗ – хіміотерапевтичні засоби

ХТП – хіміотерапевтичні препарати

ХК – хвороба Крона

ЦПД – цитопатогенна дія

ЦПЕ – цитопатогенний ефект

ЦПА – цитопатогенний агент

ПЕГ – поліетиленгліколь

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

2ДДГ – 2 дезокси-d-глюкоза

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Проблема дисбіотичних розладів залишається серед 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 [1, 2, 3]. 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 одним з найважливіших протекторних заходів з поліпшення якості життя населення [4, 5].

Однією з особливостей розвитку сучасної медицини є актуалізація вчення про нормальну мікрофлору, яку сьогодні називають «мікробіотою». 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) [1]. Разом з тим, у кишківнику та в інших системах організму людини виявлено присутність численних вірусних популяцій [6, 7]. З'ясування ролі таких вірусних популяцій в функціонуванні організму вимагає глибокого аналізу їх складу і особливостей відносин з іншими представниками мікробіому. Сукупність усіх вірусів, що знаходяться в організмі людини, сьогодні прийнято називати віромом [8].

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 [9, 10]. Разом з тим, фізіологічне значення більшості вірусів, які перебувають в організмі здорової людини, залишається не відомим. Не виключено, що найближчим часом деякі з вірусів можна буде розглядати з позиції коменсалів. 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 [11].

У світовій літературі є відносно невелика кількість публікацій щодо можливої участі ентеровірусів у розвитку дисбіотичних порушень в кишківнику людини [12, 13, 14]. В наш час, висловлюється навіть припущення про те, що присутність вірусних агентів в організмі здорової людини може бути корисною як для людського організму, так і для його мікрофлори [11].

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 [8]. Дослідження кишкового вірому, можливо, дозволить визначити роль його компонентів в підтримці здоров'я організму, а також у розвитку захворювань, особливо у пацієнтів з порушеннями імунітету, 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.

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 можливість штучного формування порушень з боку мікробіому кишківника у мишей та вивчити питання моделювання ентеровірусних інфекцій на фоні дисбіотичних станів.
5. Вивчити роль ентеровірусів у формуванні структурно-морфологічних змін кишківника та інших внутрішніх органів при експериментальному дисбіозі у мишей 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 (rct₄₀, A_{бенг}, 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, дезинфектантів» (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.

РОЗДІЛ І

СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА ПРОБЛЕМУ ДИСБІОТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ ТА РОЛЬ ВІРУСНОГО ФАКТОРУ У ЦЬОМУ ПРОЦЕСІ

(огляд літератури)

1.1 Дисбіоз як проблема цивілізації: причини виникнення та шляхи вирішення

Історія вивчення нормальної мікрофлори бере свій початок з робіт французького вченого Л. Пастера та нашого співвітчизника І.І. Мечнікова, які ще наприкінці 19 століття довели її важливу роль у функціонуванні людського організму. Сьогодні мікробіоценоз шлунково-кишкового тракту людини достатньо вивчений на генетичному і молекулярному рівнях [15, 16]. Сукупність нормальної мікрофлори в різних біотопах називають "мікробіотою", а у 2001 році нобелівським лауреатом Джошуа Ледербергом був запропонований термін "мікробіом", який сьогодні є найбільш поширеним і визначає мікробну спільноту, яка проживає на єдиній території – організмі людини [17]. Разом з тим, виходячи із сучасних досягнень мікробіоміки, вважають, що представлене Ленденбергом уявлення про мікробіом стало надто простим. Враховуючи тісний взаємозв'язок симбіотичної мікробіоти з організмом людини, під терміном «мікробіом» слід розглядати не тільки сукупність мікробних клітин, але й приепітеліальні біоплівки, які утворюються мікроорганізмами разом зі своїм макросимбіонтом.

Встановлено, що мікробіота кишківника людини сформована з трильйонів мікроорганізмів, включаючи до 200 найбільш поширених та близько 1000 видів, що рідко зустрічаються, а також показано, що загальна кількість генів мікроорганізмів перевищує людський геном в 150 разів [18]. Це дає підстави розглядати людський організм як «суперорганізм», у якому 10% клітин належить тілу людини, а 90% – мікробіому. Крім того, обмін речовин

людини певною мірою визначається ферментами, гени яких локалізовані у геномах мікробів-симбіонтів [19, 20, 21]. Мікробіом відрізняється широким спектром ферментативних активностей, мультифункціональністю і за допомогою постійного «перехресного спілкування» з макроорганізмом він робить вагомий внесок у підтримку гомеостазу тканин, імунної та метаболічної активності, розвиток нейроповедінкових реакцій та ін. [3, 22].

Серед основних його функцій є формування колонізаційної резистентності макроорганізму. Ця функція забезпечується за рахунок: феномену мікробного антагонізму між облігатною мікрофлорою товстої кишки (в основному біфідо- та лактобактеріями) і умовно-патогенними мікроорганізмами [23, 24, 25]; продукування речовин з антибіотичними властивостями (бактеріоцинів, органічних кислот); детоксикації ендо- та екзогенних токсичних речовин за рахунок їх абсорбції (природний сорбент) і виведення з організму людини (метали, феноли, різні отрути тваринного, рослинного і мікробного походження); синтезу вітамінів (комплексу вітамінів групи В, вітаміну К, фолієвої та ніотинової кислот), засвоєння вітаміну D і солей кальцію, синтез амінокислот, продукція цитокінів; посилення імунного захисту макроорганізму за рахунок стимуляції лімфатичного апарату товстої кишки; синтезу імуноглобулінів і інтерферону, а також підтримки неспецифічних факторів захисту (лізоцим, пропердин, комплемент); синтезу біологічно активних речовин, які здатні стимулювати метаболічні процеси в макроорганізмі (медіатори, ферменти, β -аланін, γ -аміномасляна кислота і ін.); участі в рециркуляції жовчних кислот, холестерину, стероїдних гормонів; ферментативне розщеплення харчових речовин, які не гідролізувались в тонкому кишківнику, в тому числі харчових волокон, які служать енергетичним ресурсом для колоноцитів і впливають на синтез ДНК (бутират), беруть участь в ліпогенезі, глюконеогенезі [26,27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. Мікробіом відіграє важливу роль в підтримці гомеостазу та розвитку імунної системи [34, 35, 36].

Кишківник найбільш щільно заселений бактеріями, тому не дивно, що кишкова мікробіота досліджується найбільш інтенсивно. В наш час вчені

часто розглядають кишкову мікробіоту як своєрідний екстракорпоральний орган, який, активно беручи участь в травленні, управлінні метаболічними процесами, підтримці цілісності епітеліального бар'єру, розвитку і зміцненні імунної системи і низки інших фізіологічних функцій, оптимізує умови для нормальної життєдіяльності організму людини загалом [26, 27, 32, 33]. Видатний вчений фізіолог Уголев А.М. стверджував, що мікрофлора є обов'язковим елементом нормальної життєдіяльності людського організму [37, 38]. Сьогодні одержано переконливі докази значного потенціалу дії нормальної мікрофлори на різноманітні процеси функціонування організму, включаючи поведінку та біохімію мозку. Останніми роками навіть процес старіння вченими розглядається як хронічний запальний процес, який супроводжується несприятливими порушеннями структури і функціональної активності мікробіому, а профілактика порушень мікробоценозу є одним з найважливіших протекторних механізмів з поліпшення якості життя населення старшого віку [39].

Досягнення в ДНК-секвенуванні та обчислювальної технології революціонізували галузь мікробіоміки, проте на багато фундаментальних питань ще належить відповісти. Очевидно, майбутні напрямки досліджень будуть орієнтовані на з'ясування більш точних механізмів, відповідальних за взаємодії між мікробіомом і людським організмом, а також на підвищення ефективності діагностичних і терапевтичних підходів до оцінки та лікування станів, асоційованих з мікробіомними порушеннями.

Нормальна мікрофлора тіла людини представлена надзвичайним якісним та кількісним різноманіттям мікроорганізмів. Вивчення мікробіома людини в наш час є одним з перспективних напрямків сучасної біології. Отримано безліч переконливих доказів величезного потенціалу дії мікробіома на різні процеси функціонування організму людини, включаючи поведінку і біохімію мозку. Ґрунтуючись на цих даних, фахівці розглядають мікробіом як додатковий орган людини, який, активно беручи участь у травленні, управлінні

метаболічними процесами, підтримці цілісності епітеліального бар'єра, розвитку і зміцненні імунної системи і ряду інших фізіологічних функцій, оптимізує умови для нормальної життєдіяльності організму людини загалом [40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47].

Сьогодні бактерієм класифікують за такими показниками [1, 16, 48]:

I. За складом бактеріальних асоціацій, що колонізують товсту кишку, виділяють:

1) облигатну (автохтонну) мікрофлору, яка складає більше 90% всіх мікроорганізмів, що заселяють товстий кишечник здорової людини (*E. coli* з незмінними властивостями, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*);

2) факультативну мікрофлору: 9,5% (*Micrococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, гриби роду *Candida* та ін.);

3) транзиторну (випадкову) мікрофлору: 0,5% (*Pseudomonas aeruginosa* та ін.).

II. За локалізацією розрізняють:

1) Пристінкову мікрофлору (М-мікрофлору), яка локалізована на епітеліоцитах товстого кишечника з утворенням мікроколоній. Цікавим є той факт, що мікроколонії, утворені бактеріями, захищені від зовнішніх впливів особливою біоплівкою, до складу якої входять полісахариди мікробного походження і муцин - секрет келихоподібних клітин. Утворений таким чином полісахаридно-муциновий матрикс виконує функцію своєрідної «плаценти», через яку здійснюється обмін речовин між пристінковою та просвітньою мікрофлорою [33, 49, 50];

2) Просвітну мікрофлору, яка знаходиться в порожнині тонкої та товстої кишки. Сьогодні показано, що просвітньої мікрофлори приблизно в шість разів менше, ніж пристінкової.

Мікробіота кишківника, як один із найчисленніших біотопів організму, є дуже чутливою до багатьох факторів [51, 52]. Раніше порушення кількісного та якісного складу нормальної мікрофлори кишківника називали *дисбактеріозом*, хоча сам термін дисбактеріоз був запропонований А. Nissle

ще в 1916 році і асоціювався з гнилісною та бродильною кишковою диспепсією, що зумовлена зниженням концентрації кишкової палички у кишківнику. Безперечно, цей термін не відповідає сучасним уявленням про характер порушень в мікробіоценозі людини, бо обмежується констатацією змін виключно бактеріального компоненту складових кишкового мікроконсорціуму. Через це у наш час частіше використовують термін дисбіоз, який більш глибоко характеризує порушення мікробної екології і, зокрема, вказує на те, що при дисбіотичних порушеннях змінюється співвідношення між різними представниками світу мікробів (бактеріями, грибами, вірусами, найпростішими), останнє супроводжується змінами їх біологічних властивостей та механізмами взаємодії з макроорганізмом. Сьогодні дисбіози найчастіше визначають як мікроекологічні порушення в різних біотопах, які супроводжуються зміною складу та функції нормальної мікробіоти. Академік Широбоков В.П. (2014) характеризує дисбіоз як такий стан мікробної екологічної системи, при якому спостерігається одночасне порушення функцій та механізмів взаємодії її ключових компонентів: макроорганізму та індигенної мікробіоти, асоційованої з слизовими оболонками порожнин та шкірних покривів [53]. Останніми роками було показано, що при дисбіозі кишківника людини зростає частота не лише захворювань шлунково-кишкового тракту, зокрема, синдрому подразненої товстої кишки (IBS), виразкового коліту тощо, але й частота таких розладів, як астма, метаболічний синдром, серцево-судинні захворювання та ожиріння [54, 55, 56, 57].

Нещодавні дослідження показали можливість тривалої персистенції в організмі значної кількості вірусів, в тому числі й здатності до інтеграції їх геномів в генетичний апарат клітини. Поява при цьому додаткової генетичної інформації може мати для макроорганізму важливе значення – він може отримати можливість функціональної перебудови відповідно до змін навколишнього середовища. Зокрема, доведеною є можливість формування в клітинах організму численних ендогенних вірусів, що є блоками вірусної генетичної інформації, якою обмінюються клітини в межах організму [1].

Питання виділення дисбіозу в окрему нозологічну форму захворювань людини є дуже дискусійним. Більшість дослідників під дисбіозом розуміють не конкретну патологію, яка формується у людини, а клініко-лабораторний синдром, що супроводжує цілий ряд як інфекційних, так і соматичних захворювань і клінічних ситуацій. Він характеризується порушенням якісного та/або кількісного складу нормальної мікрофлори, а також метаболічними, функціональними порушеннями, а у частини хворих – і клінічними проявами. Цілком очевидним є той факт, що дисбіоз кишківника завжди є вторинним і визначається основним захворюванням. Саме цим можна пояснити відсутність такого діагнозу, як «дисбіоз» або «дисбактеріоз кишківника» в Міжнародному класифікаторі захворювань людини (МКБ-10), прийнятому в нашій країні, як і в усьому світі [58].

Слід відмітити, що на початку 21 століття проблема збереження природнього мікробіоценозу людини стоїть не менш гостро, ніж за часів фундаторів вчення про нормальну мікрофлору. Сьогодні порушення складу нормальної мікрофлори реєструють у більш як 75% хворих з захворюваннями шлунково-кишкового тракту та майже 100% після лікування антибіотиками [71]. Актуалізація проблеми дисбіозу в наш час також пов'язана зі зростанням числа факторів, які здатні впливати на формування мікроекологічної системи, зумовлюючи кількісні та якісні зміни мікробних мешканців біотопів, що може призвести до порушення функціональної діяльності біоценозів, а згодом і до важких органічних змін. Взагалі, людський мікробіом характеризується багатофункціональною активністю, яка забезпечує життєдіяльність макроорганізму, але, разом з тим, нормальна мікрофлора відрізняється і вираженою вразливістю та навіть, на думку вчених, може бути свого роду індикатором негативних впливів на організм низки зовнішніх факторів [2, 53].

В наш час існує декілька підходів до класифікації дисбіозу товстого кишківника.

I. За домінуючим видом умовно-патогенних мікроорганізмів розрізняють: 1) стафілококовий; 2) стрептококовий; 3) клебсієльозний; 4)

протейний; 5) бактероїдний; 6) клостридіальний 7) кандидамікозний; 8) змішаний дисбіоз [16, 48].

II. За вираженістю кількісних і якісних порушень складу мікрофлори товстого кишківника. При цьому розрізняють 4 стадії дисбіозу:

1) компенсований, при якому спостерігається (зниження або збільшення) популяції кишкової палички; порушення пулу коротколанцюгових жирних кислот (КЖК); підвищення вмісту фенілоцтової кислоти і метиламіну;

2) субкомпенсований, характеризується помірним зменшенням кількості основних представників облигатної мікрофлори товстого кишківника (біфідо- і лактобактерій), кількісними і якісними змінами кишкової палички, зростанням популяції умовно-патогенної мікрофлори (протея, клебсієл, стафілококів та ін.), появою псевдомонад, карбонових і ароматичних амінокислот, змінами вмісту серотоніну та гістаміну;

3) декомпенсований неускладнений, супроводжується істотним зменшенням біфідо-і лактобактерій у вмісті товстого кишківнику (до 10^5 - 10^6 /г фекалій), вираженими якісними змінами кишкової палички, значним зростанням кількості умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів з проявом їх вірулентних властивостей; метаболічними порушеннями (зменшенням вмісту фенольних сполук, підвищенням рівня фенілпропіонової кислоти та ін.);

4) декомпенсований ускладнений, супроводжується різким зменшенням або повною відсутністю біфідо- та лактобактерій, суттєвим зменшенням кількості кишкової палички, домінуванням умовно-патогенних і патогенних бактерій та грибів роду *Candida*, глибокою розбалансованістю біохімічних регуляторних механізмів мікробної екосистеми товстої кишки з накопиченням в ній ентеро- і цитотоксинів, ознаками ендотоксинемії, дисфункцією шлунково-кишкового тракту, іноді з деструкцією кишкової стінки; при цьому можливий розвиток бактеріємії та сепсису [27, 59, 60, 61, 62, 63].

Серед причин дисбіотичних порушень на першому місці стоїть використання хіміотерапевтичних антимікробних засобів, найчастіше широкого спектру дії та з пероральним механізмом введення. Особливо небезпечним в цьому плані є використання антибіотиків з профілактичною метою [19]. На жаль, не існує сьогодні антимікробних лікарських засобів, які б впливали виключно на патогенних мікроорганізмів і не впливали б на мікробіом в цілому. Не раціональне, не обґрунтоване та часто безконтрольне використання антибактеріальних хіміотерапевтичних засобів в медичній практиці призводить до штучної селекції полірезистентних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів. Такі мікроорганізми є небезпечними ще й тому, що вони здатні поширюватись в медичних закладах і бути причиною внутрішньолікарняних інфекцій. В сучасних умовах найчастіше мультирезистентність набувають такі мікроорганізми як *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus ssp.*, *Citrobacter ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter ssp.*, *Klebsiella pneumoniae* та деякі інші [64]. Цікавим є той факт, що останніми роками в Індії були виявлені так звані «супербактерії», які характеризувались виключною стійкістю, «панрезистентністю» до переважної більшості відомих на сьогодні антибіотиків [65]. Серед згаданих «супербактерій» найчастіше зустрічались *Escherichia coli* й *Klebsiella pneumoniae*. Вчені пов'язують таку високу резистентність з присутністю у зазначених бактерій гену blaNDM-1, який кодує синтез ферменту NDM-1 (New-Delhi metallo- β -lactamase-1). Саме цей фермент відповідає за формування резистентності до антибіотиків класу β -лактамів. Крім того, встановлено, що гени такого типу резистентності за допомогою кон'югативних плазмід здатні поширюватись у мікробній популяції, і це створює особливу занепокоєність світової медичної громади. Крім того, антибіотикоіндуковані дисбіотичні порушення майже завжди супроводжуються зниженням колонізаційної резистентності організму, а також розвитком вторинних імунодефіцитних станів, які сприяють як інфікуванню людини нозокоміальними екзогенними штамми, так і зростанню

вірулентності умовно-патогенних мікроорганізмів власної аутофлори [64, 66, 67]. Показано, що умовно-патогенні мікроорганізми, які набули резистентність, здатні мігрувати по шлунково-кишковому тракту і згодом колонізувати інші порожнини людського організму (сечовивідні, дихальні шляхи), викликаючи там гнійно-запальні процеси [19, 68]. Крім того, використання антибіотиків може призвести до зростання в організмі концентрації бактеріальних ендотоксинів, які звільняються при пошкодженні клітинної стінки грамнегативних мікроорганізмів. Відомі антибактеріальні препарати, які здатні самі стимулювати синтез токсичних метаболітів у деяких бактерій [69].

Разом з тим, нині відомі й інші групи препаратів, які здатні сприяти формуванню дисбіозу за рахунок впливу на склад муцину (нестероїдні протизапальні препарати, послаблюючі, жовчогінні, обволікаючі засоби з сорбуючими властивостями та деякі інші) [70].

Не дивлячись на те, що основною причиною формування дисбіотичних порушень прийнято вважати використання антибіотиків, сьогодні відомо про існування факторів, які можуть впливати на формування нормальної мікрофлори вже в антенатальному та неонатальному періоді: погіршення репродуктивного здоров'я жінок, штучне вигодовування, нераціональне використання антибактеріальних засобів [71]. В постнатальний період формування нормофлори людини може залежати від характеру харчування, забрудненості навколишнього середовища, зокрема радіонуклідами, пестицидами, важкими металами, які, різними шляхами потрапляючи до організму людини, можуть порушувати кишковий мікробіоценоз. Доведено, що психоемоційні стреси можуть сприяти зниженню кількості представників індигенної мікрофлори в різних біоценозах і, відповідно, розвитку дисбіозів [64]. Крім того, збільшенню кількості дисбіотичних порушень може сприяти поширення використання в медичній практиці гормональної терапії та імуномодуляторів (імуносупресорів та імуностимуляторів), які за рахунок

зміни загальних та місцевих імунних реакцій здатні порушувати фізіологічні механізми взаємовідносин в системі «організм людини - мікробіом» [2].

В цілому, сьогодні причини дисбіотичних порушень прийнято класифікувати на екзогенні та ендогенні [16, 18, 72]. До основних екзогенних факторів відносять техногенне забруднення довкілля (іонізуюче випромінювання, важкі метали та інші токсичні сполуки); несприятливі санітарно-гігієнічні умови життя; кліматично-географічні зміни; діяльність, пов'язану з впливом шкідливих факторів (промислові отрути тощо); травми та інші фактори, пов'язані з фізичним або хімічним впливом на організм. Натомість ендогенними факторами є первинні порушення процесу формування біоценозу у період новонародженості (перинатальні інфекції, погіршення репродуктивного здоров'я населення, патологія вагітних і породіль, штучне вигодовування дітей, порушення умов утримання новонароджених, неадекватна терапія, вроджені анатомічні аномалії тощо); стресові стани; нераціональне харчування; вікові зміни; нераціональна медикаментозна терапія (антибіотики, цитостатики, імунодепресанти, променева терапія та хіміотерапія, гормональні препарати, обволікаючі, відхаркувальні, проносні препарати тощо) [2, 64, 70, 72]. При цьому саме вживання антибіотиків, особливо перорально, є ключовим фактором формування дисбіозів. Через це останніми роками особлива увага периділяється розробці гіпотетичних математичних моделей прогнозованої чутливості мікроорганізмів до антибіотиків з використанням нормативного аналізу з конкретизацією значень абсолютного та відносного оптимуму [73, 74].

Поширена раніше думка про те, що дисбіоз є виключно наслідком інших захворювань, а мікрофлора здатна відновитись після медикаментозного лікування самостійно, сьогодні піддається сумнівам. Встановлено, що порушення складу нормальної мікрофлори, які сформувалися в ранньому дитинстві, в період так званої «незрілості» імунітету, є найбільш стійкими і важко піддаються корекції в старшому віці [1, 75, 76]. Водночас, в ранньому

віці найбільш легко оптимізується процес становлення здорового мікробіому, якщо вчасно вжити адекватних заходів. Зокрема, такий досвід є у київських неонатологів, які використовують мультипробіотики «Симбітер®» у вагітних, матерів-годувальниць та новонароджених з перших годин життя [77].

Відповідно з останніми даними формування мікробіома людини починається ще *in utero* і триває упродовж декількох років після народження людини [1, 2, 5]. На думку вчених, різноманітні популяції симбіотичних мікроорганізмів залучені в ріст і розвиток організму, впливають практично на усі його фізіологічні функції, у тому числі імунні, метаболічні, поведінкові і регуляторні реакції і відповіді, продукують різноманітні сигнали, які визначають його здоров'я, починаючи від періоду внутрішньоутробного розвитку до глибокої старості [5]. Водночас, спосіб життя сучасної людини сприяє негативним змінам її мікрофлори, які призводять до формування в літньому віці «виснаженого» мікробіому. Нераціональне харчування, шкідливі звички, несприятлива екологія, нервово-емоційні стреси, низький соціальний рівень багатьох літніх людей, часте лікування антибіотиками й іншими медикаментозними засобами, гіподинамія неминуче ведуть до руйнування мікробіому, заміни фізіологічних мікроорганізмів на умовно-патогенні таксони. Ослаблений мікробіом поступово трансформує симбіотичні зв'язки з організмом людини в антагоністичні стосунки, починає функціонувати як конкурент, що бореться з макроорганізмом за нішу для мешкання і харчові субстрати. Вивчаючи багато років колонізаційні властивості бактерій виду *Helicobacter pylori*, які розглядаються як одна з причин розвитку виразкової хвороби і раку шлунку, американський дослідник M.J. Blaser дійшов висновку, що цей мікроорганізм стосовно більшості молодих людей виявляє корисні симбіотичні властивості, а хворобу викликає переважно в осіб літнього віку. Вчений висловив думку про еволюційну роль мікробіома людини в підтримці молодого популяції населення, збільшуючи при цьому ризик смерті людей літнього віку, оскільки, виходячи з репродуктивного віку, людина вже не бере участі в підтримці виду [78]. Зі

свого боку, науковці з Угорщини й Німеччини (L. Rózsa et al., 2015), досліджуючи зміни мікробіома при старінні і захворюваннях, запропонували гіпотезу «бунтуючого» мікробіома [79]. На думку авторів цієї гіпотези, дехто з представників мікробіома літніх або хворих індивідуумів, на відміну від аналогічних мікробних популяцій молодих людей, виявляють тенденцію до зсуву своїх фенотипічних властивостей у напрямку прояву агресивних властивостей щодо свого нещодавнього макросимбіонту, що призводить до прискорення його смерті. Як стверджують автори, при стресі, хворобі і дегенеративних вікових змінах організм людини виділяє сигнальні молекули, на які реагують мікроорганізми і перетворюються з дружніх мешканців біотопів в небезпечних конкурентів. Ще на початку ХХ століття наш співвідчизник І. І. Мечніков запропонував гіпотезу передчасного настання старості і смерті, яку обґрунтував на дисгармонії, пов'язаній з перебуванням в організмі великої кількості шкідливих мікробів. На думку вченого, перенасичення товстої кишки популяціями гнильних мікроорганізмів є джерелом постійної інтоксикації, яка прискорює процеси старіння організму [80].

Останніми роками значно зріс інтерес до вивчення пробіотиків. Однією з причин такої підвищеної уваги до даної проблеми є результати численних експериментальних досліджень, в яких показано важливу роль окремих представників нормальної мікрофлори у етіології та патогенезі багатьох інфекційних та навіть соматичних захворювань людини [81, 82]. З метою корекції дисбіотичних станів використовують низку препаратів з різними механізмами дії. Механізми, відповідальні за різноманітні пробіотичні ефекти, зазвичай пов'язують зі здатністю пробіотиків пригнічувати розвиток патогенних мікробів, проявляти імуномодулюючі властивості, стимулювати проліферацію і диференціацію епітеліальних клітин, а також сприяти зміцненню кишкового бар'єру [83, 84].

Сучасна класифікація препаратів для корекції мікробіоценозу ранжирувана на кілька позицій: пробіотики, парабіотики (імунобіотики),

пробиотики, синбіотики, препарати метаболітного типу, продукти функціонального харчування, нутрицевтики, ентеросорбенти [2, 64, 67]. Серед них сьогодні найбільш вивченими є препарати пробиотики. Термін «пробиотики» був запропонований Ліллі та Стиллуелом в 1965 р. На відміну від антибіотиків, спочатку пробиотики характеризувались як мікробні фактори, які здатні стимулювати ріст інших мікроорганізмів [85, 86]. Сьогодні найчастіше пробиотики розглядають як фармацевтичні препарати, що містять живі мікроорганізми, які мають позитивний вплив на фізіологічні, біохімічні та імунні процеси в організмі людини шляхом оптимізації та стабілізації функції мікробіоти [1].

Препарати пробиотичного ряду, що використовуються зараз у клінічній практиці, можна поділити на 7 поколінь: I – пробиотики на основі монокультур облігатної нормофлори кишечника; II – 2–4-компонентні пробиотики на основі облігатної або факультативної нормофлори кишечника; III – пробиотики на основі транзиторних мікроорганізмів, що не властиві для нормофлори людини; IV – синбіотики; V – препарати на основі рекомбінантних генноінженерних штамів; VI – полікомпонентні пробиотики на основі комплексу ліофілізатів штамів лактобацил і біфідобактерій; VII – мультипробиотики на основі “живих” мутуалістичних симбіозів фізіологічних цукролітичних бактерій [19, 53, 72]. Саме використання мультипробиотичних препаратів сьогодні займає провідні позиції, зокрема, доведено їх позитивний вплив на загальну резистентність організму дітей з частими респіраторними захворюваннями, рецидивуючими бронхітами, а також у дітей з ревматичними хворобами, а розроблений та впроваджений в практику системний підхід до застосування мультипробиотиків з перших днів життя, спрямований на відновлення та підтримку фізіологічного мікробіому у дітей з ризиком розвитку патології, значно зменшує рівень захворюваності [64]. Слід відмітити, що деякі пробиотики, зокрема 2–4-компонентні, на основі облігатної або факультативної нормофлори кишківника, містять представників умовно-патогенної мікрофлори. Разом з тим, однак, у висновках вчених щодо

безпеки використання даних препаратів, особливо в педіатрії, поки що не спостерігається [85, 87].

З року в рік зростає кількість наукових повідомлень про доцільність використання пробіотиків для лікування цілої низки захворювань, в тому числі й соматичних: синдрому подразненого кишківника, діареї, закрепів, дерматиту, харчової алергії, вагініту та ін. [88]. Проте, є ряд досліджень з плацебо контролем, які присвячені вивченню ефективності пробіотичних препаратів при цій патології [89, 90]. Майже 75% таких досліджень показали позитивний вплив пробіотичних препаратів, при чому більшість досліджень проводились на дітях.

Разом з тим, залишається дискусійним питання, які з видів пробіотичних мікроорганізмів є найбільш корисними для макроорганізму і, відповідно, найбільш ефективними з позиції лікування, тому що одні з них сприяють зменшенню метеоризму, інші нормалізують частоту актів дефекації, деякі мають сумарний позитивний ефект [62, 87, 91]. За результатами провідних досліджень найбільш позитивний вплив на організм людини мають біфідобактерії (*Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis* та *Bifidobacterium bifidum*) [19]. Не дивлячись на постійне розширення препаратів на основі нових видів мікроорганізмів, в нашій країні найбільш популярними залишаються препарати на основі живих мікробних клітин, в першу чергу біфідобактерій, лактобацил та пропіоновокислих бактерій. Їх безпека використання є абсолютно доведеною, ефективність перевірена тривалим використанням в клінічній практиці. Деякі дослідники спостерігали найбільш позитивний ефект після використання мультипробіотичних (полікомпонентних) препаратів, які, безперечно, є суттєвим прогресом в галузі створення нових пробіотиків [2, 19, 92].

Водночас слід відмітити, що шляхом наукового процесу відбору сьогодні існує можливість ізолювати біологічно активні штами фізіологічної мікрофлори з біотопів людини та на їх основі сконструювати полікомпонентні симбіози, які здатні функціонувати як єдиний організм, життєдіяльність якого

базується на взаємовигідних метаболічних та енергетичних механізмах [92, 93].

Враховуючи здатність пробіотиків пригнічувати ріст та розмноження популяцій потенційно шкідливих мікроорганізмів, деякі вчені вважають, що найбільш раціонально їх використовувати при інфекційній та антибіотикоасоційованій діареї, а також синдромі подразненого кишківника [66]. Однак, спектр використання пробіотичних препаратів надзвичайно широкий і з кожним роком він продовжує зростати. Це пов'язано з отриманням нових даних, які свідчать про доцільність використання пробіотиків в складі комплексної терапії хворих з серцево-судинними, акушерсько-гінекологічними, інфекційними, урологічними захворюваннями, пацієнтів з бронхіальною астмою [87]. Доведеною є роль мікроекологічних порушень у розвитку атеросклерозу та розшифровано механізм зниження мікроорганізмами холестерину [94, 95]. Встановлено здатність пробіотичних мікроорганізмів знижувати рівень ліпідів низької щільності у хворих з гіперхолістеринемією [96].

Результати експериментальних досліджень свідчать про здатність деяких пробіотиків стимулювати неспецифічні захисні реакції організму, зокрема фагоцитарну активність нейтрофілів та натуральних кілерних лімфоцитів, продукцію цитокінів [64]. Цікавими є дослідження здатності окремих метаболітів лакто- та біфідобактерій до гальмування проліферації пухлинних клітин, а також їх сприяння активізації протипухлинного імунітету [64, 109]. Останніми роками активно вивчаються антиалергічні властивості пробіотиків, що пов'язано із здатністю окремих штамів пробіотичних мікроорганізмів руйнувати мікробні та харчові токсини і зменшувати тим самим розвиток алергічних реакцій [75]. Показано також позитивний ефект пробіотичних препаратів в комплексній терапії аутоімунних процесів [97].

Не зважаючи на розширення арсеналу пробіотиків, більшість сучасних препаратів через не високу їх ефективність вже не здатні задовольнити потреби клініцистів. Велика група пробіотиків містить умовно-патогенні

мікроорганізми і тому є небезпечною при лікуванні дітей та дорослих з порушеннями в імунному гомеостазі, оскільки здатні в ослабленому організмі провокувати розвиток серйозних інфекційних ускладнень. Спроби підвищення ефективності пробіотиків за рахунок створення комплексних препаратів на основі пробіотичної мікрофлори та біологічно-активних добавок, що стимулюють її розвиток, також не призвели до помітного позитивного результату. Достатньо інтенсивно в останні роки розвивається напрямок, що базується на створенні пробіотиків на основі мікрофлори, іммобілізованої на частках активованого вугілля [92]. По даним спеціалістів, що працюють в цій галузі, іммобілізація мікрофлори супроводжується формуванням на частках сорбенту мікроколоній, що більш інтенсивно заселяють біотопи кишечника.

Більшість дослідників для оцінки ефективності та безпечності пробіотиків використовують виключно мікробіологічний підхід, однак він не дає можливості в повній мірі оцінити ефективність даних препаратів. Є спостереження, що одним з найбільш об'єктивних додаткових методів патогенетичної оцінки дії пробіотиків, які використовуються для корекції дисбіозу кишечника, є електронно-мікроскопічне дослідження з якісним і кількісним аналізом структурно-морфологічних порушень [98].

В наш час особливий інтерес вчених прикутий до нового напрямку мікробіомної терапії, який базується на трансплантації кишкової мікробіоти [1, 99]. Дослідження на тваринах дали досить обнадійливі результати, які свідчать про можливість фекальної трансплантації отримувати позитивні результати при різноманітній патології, асоційованої з стійкими змінами в складі мікробіому [100]. На думку спеціалістів такий підхід є відносно безпечний, дешевий та ефективний [101]. Разом з тим, мікрофлора, яка трансплантується, повинна бути детально досліджена на присутність патогенів, особливо вірусної природи.

Порушення мікробної екології, як правило, супроводжується забрудненням внутрішнього середовища організму токсичними сполуками як

екзогенної, так і ендогенної природи, тому до групи засобів оздоровлення нормальної мікрофлори також можна віднести і деякі види ентеросорбентів. Механізм їх дії великою мірою обумовлений санацією просвіту кишки і поліпшенням за рахунок цього умов для життєдіяльності фізіологічної мікробіоти.

Ентеросорбція є неінвазивним патогенетично обґрунтованим способом терапії і при виборі адекватного сорбенту може сприяти ефективному очищенню організму від токсинів, метаболітів, активних перекисних сполук, вірусів, інших мікроорганізмів. Оздоровлення біотопів оптимізує умови для функціонування фізіологічного мікробіому. При цьому, за рахунок сорбції та елімінації з кишківника конкурентної патогенної і умовно-патогенної мікрофлори, деякі ентеросорбенти не мають негативного впливу на мікробіоценоз кишечника. Більш того, сьогодні показано, що така «санація» біотопів може бути корисною для мікробіоти [102]. Відомі також дані про високу ефективність використання ентеросорбентів разом з антибактеріальними препаратами або пробіотиками в лікуванні гострих кишкових інфекцій з перших днів захворювання [91, 103].

Донедавна препарати на основі сорбентів найчастіше розглядались як препарати для лікування різного роду інтоксикацій. В наш час ентеросорбенти використовують не лише в якості патогенетичної, але й етіотропної моно- й комбінованої терапії при кишкових інфекціях, що є актуально з огляду на стрімке зростання полірезистентності мікроорганізмів до антибіотиків та хіміопрепаратів [104, 105].

Видатний вітчизняний геронтолог, академік НАН та АМН України Фролькіс В.В., який все своє наукове життя займався вивченням фундаментальних проблем старіння та вікової патології, науково обґрунтував можливість використання ентеросорбентів для продовження життя. Вчений вважав, що однією із важливих ланок старіння організму, як багатопричинного процесу, є аутоінтоксикаційний компонент, і на основі цього він запропонував

використовувати в геронтології метод кишкової детоксикації (ентеросорбції) [106].

Експериментальні дослідження із застосуванням ентеросорбентів (різновидів синтетичного вугілля) на старих щурах (28 місяців) продемонстрували зростання середньої тривалості життя експериментальних тварин на 43,4 %. Внаслідок тривалого вживання ентеросорбентів значно пізніше наступало пошкодження клітин, розростання сполучної тканини в органах, в нервових тканинах, менш виражена атрофія, менш виражений склероз судин. Використання розробленого способу в Інституті геронтології (м. Київ) при лікуванні людей похилого віку дало також позитивний результат. Після проведених курсів ентеросорбції у пацієнтів відбулися позитивні зміни у картині крові, сповільнювалися гормональні зміни, підвищувалась стійкість серцево-судинної системи до фізичних навантажень [107, 108].

Слід відмітити, що використання ентеросорбентів також знайшло достатньо широке застосування у ветеринарії у вигляді кормових добавок [110, 111, 112]. Доведено сприятливий вплив кремнійорганічних сорбентів на репродуктивну здатність [113, 114]. При вивченні препарату Ентеросгель в експерименті на тваринах було зафіксовано значний приріст маси тіла, а показник виживання збільшився з 76 % до 97% [110].

В наш час, активно вивчається ефективність використання монтморилонітових глин (смактитів), до яких належить бентоніт, для лікування і профілактики інфекційних кишкових захворювань [115]. Вживання смактитів може попереджувати порушення мінерального обміну, яке відіграє важливу патогенетичну роль при значній кількості захворювань [116, 117]. Важливе місце серед компонентів, що входять до смактиту, посідає кремній, який відіграє важливу роль у життєдіяльності організму [112]. Наприклад, у людини особливо багаті на кремній сполучні тканини, шкіра, кістки, емаль зубів, волосся, легені, щитовидна залоза, гіпофіз і надниркові залози. У епітелії шкіри кремній хімічно пов'язаний з кератином і разом з сіркою з'єднує макромолекули цього білку поперечними містками,

підвищуючи тим самим його хімічну і механічну стійкість, а також непроникність для рідин. У кровоносних судинах кремній знаходиться головним чином в еластині і перешкоджає відкладенню ліпідів, нормалізує проникність стінок і підвищує їх еластичність [112].

Раніше проведені експериментальні дослідження бентоніту, показали його виражену здатність до стимуляції росту популяцій цукролітичних анаеробних бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactocobacillus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus* та *Streptococcus* [76]. Вплив бентоніту на стан кишкового мікробіому був відмічений іншими дослідниками. Так, наприклад, в дослідях на тваринах встановлено, що споживання бентоніту сприяє значному зниженню рівня потенційно-патогенних мікроорганізмів (*Gallibacterium anatis*, *Clostridium aldenense*, *Bacteroides dorei*, *Helicobacter pullorum*, *Campylobacter jejuni*) [118, 119].

Оскільки цукролітично-анаеробна ланка мікробіому відіграє найбільш значущі фізіологічні функції, посилення її представництва може чинити позитивний вплив на фізіологію макроорганізму. Одним із механізмів стимуляції бентонітом цукролітичних бактерій є формування сприятливих для цих мікроорганізмів анаеробних умов [76]. Крім того, бентоніт активізує розвиток пробіотичних бактерій за рахунок наявності в ньому цінних мінеральних сполук, необхідних для життєвих процесів мікроорганізмів [120]. Зокрема, той факт, що деякі бактерії здатні здобувати неорганічний кремній з мінералів і використовувати його у своєму метаболізмі, відомий давно [121]. Такі мікроорганізми можуть бути присутніми і у складі мультивидових біоценозів травного тракту людини та тварин.

Таким чином, на даний час накопичено значну кількість науково обґрунтованих свідчень того, що адекватна корекція дисбіотичних порушень за допомогою пробіотиків та сорбентів сприяє оптимізації процесів адаптації і компенсації порушених функцій, корекції патологічних змін метаболізму, досягненню імуномодельюючого, антиоксидантного та інших важливих ефектів. З року в рік нестримно збільшується арсенал засобів для підтримання

та відновлення мікроекологічного статусу людини. Водночас при розробці таких препаратів слід враховувати важливість відновлення структури та функціональної активності приєпітеліальних біоплівки, через що розробка нових препаратів є перспективною на майбутнє.

1.2 Людський віром – як компонент мікробіому: сучасний стан вивчення

Віром – вірусний компонент мікробіому, який являє собою сукупність усіх вірусних популяцій, що перебувають в організмі людини. Не дивлячись на фундаментальні дослідження, людський віром залишається менш вивченим в порівнянні з тими представниками мікробіому, які мають бактеріальну чи грибку природу. Наразі відомо, що кишківник містить ~ 1200 найбільш поширених видів мікроорганізмів. Крім того, сьогодні встановлено, що мікробіом кишківника містить генів в 150 разів більше, ніж геном організму людини [122]. Дослідження вірому найчастіше проводять шляхом метагеномного аналізу ДНК, виділеної безпосередньо з біотопів організмів. Даний метод не потребує ізоляції і культивування окремих видів мікробних агентів, проте такі експериментальні підходи мають низку труднощів та обмежень, пов'язаних з особливістю виділення та аналізу вірусного генетичного матеріалу, через це абсолютна чисельність людського вірому наразі залишається невідомою. Завдяки метагеномним підходам за останні роки виявлено більш як 80% вірусів – мешканців товстого кишківника та показано, що понад 10% людського геному представлено вірусними елементами і транспозонами [123, 124]. Особливістю вірусних метагеномів, є те, що вони містять гени, пов'язані з реплікацією, рекомбінацією та репарацією, а також з деякими наразі невідомими функціями, які забезпечують репродукцію та поширення вірусів [125, 126].

Постійно оновлюючись, віром включає представників, які здатні інфікувати клітини еукаріотів (еукаріотний віром); фаги бактерій

(бактеріальний віром); бактеріофаги, що здатні розмножуватись в археях (архейний віром); профаги; ендегенні ретровіруси, а також деякі окремі вірусні елементи, які є вбудованими в геном людини [7, 125, 126]. Концентрація вірусів в організмі ссавців може сягати 10^{14} [127, 128]. Крім того, серед представників людського вірому можна виділити мутуалістів, які мають позитивний вплив на організм людини, паразитів, що викликають гострі та хронічні інфекційні процеси, і коменсалів, які не викликають захворювань у людей (рис. 1.1).

Більшість детально вивчених представників вірому є бактеріофагами. Деякі з них надзвичайно поширені: бактеріофаг *CrAssphage*, безпосереднім хазяїном якого є бактерії роду *Bacteroides*, виділяється більш як у половини населення планети і зустрічається на всіх континентах [129, 130]. Не зважаючи на те, що більшість бактеріофагів в наш час є не до кінця класифіковані, найбільш поширеними з них у кишківнику ссавців вважаються двониткові ДНК-фаги родини *Siphoviridae*, *Podoviridae* та *Myoviridae* та одноланцюгові ДНК-бактеріофаги з родини *Microviridae* [125, 131, 132, 133, 134]. Бактеріофаги, шляхом регуляції метаболізму бактеріальних клітин та пошкодження їх структури, можуть суттєво впливати на функціонування організму людини [135, 136, 137, 138]. Їх розмаїття може зростати з віком і суттєво залежати від раціону харчування людини [139, 140, 141].

Так званих «людських еукаріотичних» вірусів (вірусів, які здатні вражати еукаріотичні клітини) в кишківнику набагато менше. Деякі з них, зокрема ендегенні ретровіруси, які займають близько 8% геному людини, раніше взагалі вважались «генетичним сміттям», яке накопичилось у геномі людини в процесі еволюції [142, 143, 144]. Пізніше було встановлено, що «людські еукаріотичні» віруси мають значний вплив на фізіологічні процеси в організмі. До еукаріотичних вірусів відносять представників родин *Caliciviridae*, *Anelloviridae*, *Circoviridae* та ін. (виявляються у здорових індивідуумів і, очевидно, залишаються у кишківнику людини після захворювання). Крім цього, сьогодні до них віднесені всі некласифіковані вірусні агенти, при

секвенуванні нуклеїнових кислот яких зафіксовано відмінність від описаних нині вірусів [132, 145, 146, 107, 147, 148, 149, 150, 151]. Підтвердженням того, що такі віруси можуть існувати в кишківнику і не викликати патології, є дослідження вірусу MNV (РНК (+) – вірусу з родини *Caliciviridae*), що тропний до мієлоїдних клітин, але не викликає виражених клінічних симптомів хвороби в імунокомпетентних тварин [165]. В наш час вчені часто виявляють РНК-віруси при безсимптомних формах, зокрема у дітей, а також після перенесеного гострого гастроентериту [65, 66].

В організмі людини, зокрема в кишковому тракті, можуть знаходитись і фітопатогенні віруси таких родин, як *Virgaviridae*, які, швидше за все, потрапляють туди з рослинною їжею. Кількість та видове розмаїття цих вірусних агентів значною мірою залежить від раціону харчування. В життєдіяльності рослин симбіотичні віруси відіграють важливу роль: вони здатні регулювати активність ферментів в залежності від змін навколишнього середовища, стимулювати або пригнічувати ріст рослин, регулювати активність фотосинтезу, впливати на швидкість засвоєння кисню та виділення вуглекислоти, а також на транспортування води і окраску рослин [1, 123].



Рис. 1.1. Людський віром

Віром є універсальним фактором адаптації, результатом якої є формування збалансованої біосистеми, що відіграє важливу роль в еволюційному розвитку біосфери в цілому. Унікальність і неповторність кожної людини пов'язана в тому числі і з унікальністю його «співмешканців» - вірусних популяцій, здатних впливати на формування мікробного розмаїття в біотопах людини та на її здоров'я в цілому. Віром є своєрідним генетичним «паспортом» макроорганізму. Склад вірому в значній мірі залежить від фізико-хімічних та біологічних характеристик біотопів – умов проживання, через що вірусні популяції, які знаходяться у крові, верхніх дихальних шляхах, кишківнику, на шкірі та слизових оболонках, у ротовій порожнині, статевих органах тощо, можуть суттєво відрізнитися за видовою характеристикою [152, 123, 125, 153].

Початок формування вірому відбувається в дитячому організмі одночасно з його первинною бактеріальною колонізацією. Протягом першого тижня життя у кишковому вмісті немовлят визначається до 10^8 /г вірусних часточок. На першому році життя дітей в складі вірусного компоненту мікробіому домінують бактеріофаги, при чому понад 50% з них – фаги *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Listonella* [135, 125, 154]. Так звані «еукаріотичні» представники вірому починають виявлятися у дітей лише на 2-3 році життя. В цілому, у дітей раннього віку видова різноманітність вірому є дуже низькою. Починаючи з 4-5 року життя його видовий склад помітно розширюється і до 14-15 р. наближається до характеристик дорослої людини.

Представників вірому виявляють у надзвичайно різноманітних біотопах - на поверхні шкіри та слизових оболонках, вони заселяють усі порожнини, циркулюють в крові, спинномозковій рідині та інших біологічних рідинах (які, до речі, донедавна вважались стерильними), можуть тривалий час перебувати в нейронах, гемопоетичних стовбурових клітинах, клітинах ендотелію судин та багатьох інших клітинах, деякі з них можуть бути інтегровані з хромосоною

[155]. Фрагменти вірусних нуклеїнових кислот виявлені в геномах майже всіх організмів (від кишкової палички до людини) [123].

Не дивлячись на те, що мікробіоценози організму людини характеризуються більш-менш сталим видовим складом вірусного компоненту мікробіому, одні і ті ж представники вірому можуть заселяти різні екологічні ніші організму людини. Наприклад, герпесвіруси, поліома- та папіломавіруси, а також деякі інші можуть вегетувати як на слизових оболонках дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту, на шкірі, в кровоносному руслі та сечостатевої системі. Крім того, на склад вірому може впливати спосіб життя, раціон, етнічна належність, регіон проживання та деякі ще не до кінця вивчені фактори [156, 128, 140, 141].

Відомо, що кишкові мікроорганізми можуть суттєво регулювати фізіологічні процеси організму людини. Разом з тим, якщо симбіотичний внесок синантропних бактерій в цьому процесі є відомим, то роль вірусів, які присутні в організмі, до кінця не є визначеною. Для макроорганізму такі симбіотичні відносини можуть бути корисними, оскільки представники вірому здатні їх захищати від хвороботворних агентів, а також сприяти зростанню резистентності організму і формуванню механізмів його адаптації в зовнішньому середовищі [123].

Разом з тим, в окремих випадках зниження імунного статусу макроорганізму зростає ймовірність розвитку дисбалансу таких симбіотичних відносин, що може трансформуватись у взаємну агресію. Через це в наш час людський віром розглядають з двох абсолютно протилежних позицій. З одного боку, це потенційно небезпечне джерело вірусної інфекції в організмі. Основним аргументом такої позиції вчені наводять облігатний внутрішньоклітинний паразитизм вірусів. При цьому розглядається роль вірусів не лише з позиції етіологічного джерела інфекцій, а й участі в патогенезі таких важких хронічних захворювань як синдром хронічної втоми, повільні вірусні інфекції та інші дегенеративні процеси нервової системи, діабет 1 типу, деякі хронічні запальні захворювання кишківника тощо [159].

Для макроорганізму взаємодія із бактеріофагами може мати також негативні наслідки, оскільки вони є важливим резервуаром генів токсигенності та множинної резистентності до антибіотиків, і через горизонтальний переніс генів можуть сприяти підвищенню вірулентності бактерій [160]. З іншого боку, багато вчених розглядають віром як вірусний компонент нормальної мікрофлори – мікробіому, і з кожним роком зростає кількість доказів, які показують його важливе фізіологічне значення для організму людини. Важливим аргументом такої позиції є те, що численні «еукаріотичні» віруси, зокрема представники родин *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Papilemaviradae*, *Polioviridae*, *Herpesviridae* та деякі інші можуть бути присутніми як в організмі хворих людей, так і виділятися від здорових осіб [1, 152]. Більш того, вчені наводять численні докази важливих фізіологічних функцій, притаманних представникам людського вірому. Так, деякі з герпесвірусів та аденовірусів здатні підтримувати та стимулювати механізми імунного захисту через регуляцію імунофенотипу, індивідуального для кожної людини, а також можуть підвищувати резистентність організму людини до вірулентних вірусів шляхом активації імунних реакцій [123]. Припускається, що представники вірусного компоненту мікробіому також можуть виконувати і захисні властивості. Зокрема вірус *HERV-W* (*Human Endogenous Retrovirus-W*) здатен кодувати синтез білка синцитину, який захищає ембріон від агресивного впливу імунної системи материнського організму та деяких патогенних вірусів, а вірус *GBBC* (*Pegivirus A*) гальмує процес поширення ВІЛ в людському організмі. Дослідження на лабораторних тваринах демонструють здатність герпесвірусів активувати натуральні кілерні клітини (НК-клітини), які мають виражену протипухлинну дію, а вірусів *Murine norovirus* стимулювати формування лімфоїдних клітин й активувати імунну відповідь завдяки стимуляції продукції інтерферону [161]. Існують також повідомлення про здатність норовірусів компенсувати шкідливий вплив антибіотиків, сприяючи

відновленню тканин кишківника, пошкоджених запаленням і, таким чином, виконувати функції нормальної мікрофлори [129, 162].

Деякі «прокаріотичні віруси», до яких відносяться бактеріофаги, можуть ініціювати гуморальні імунні реакції та регулювати синтез цитокінів, підтримувати нормальний бактеріальний баланс в біотопах макроорганізму та реалізовувати свої механізми генетичних рекомбінацій шляхом процесу трансдукції. На думку окремих вчених, віром через специфічні сигнальні молекули здатен впливати на транскрипцію в тих клітинах макроорганізму, які навіть не містять вірус, і таким чином регулювати процес формування транскрипційного фенотипу людини [7, 123, 163].

На сьогодні існує обмежена кількість наукових робіт, в яких йдеться про механізми взаємодії вірому з імунною системою хазяїна. Кишкова імунна система перебуває в постійній, безперервній і динамічній рівновазі з всіма представниками кишкового мікробіому та вірому [164]. Цілком ймовірно, що взаємодія між ними може вплинути на здоров'я і захворюваність хазяїна шляхом безпосередньої модуляції імунної системи [165, 159].

Деякі дослідники висловлюють припущення про важливу роль вірусів у формуванні імунних механізмів захисту макроорганізму проти вірусних, а, можливо, й бактеріальних інфекцій. Зокрема показано, що віруси, які здатні постійно знаходитись в організмі людини (герпесвіруси, поліомавіруси, аденовіруси та інші), викликаючи гострі чи латентні інфекції, можуть в подальшому захищати хазяїна від деяких вірусних і бактеріальних інфекцій [163]. Крім того, після інфекції, викликаной γ -герпесвірусом, відбувається зростання у мишей резистентності до *Listeria monocytogenes* та *Yersinia pestis* [166]. В наш час деякі віруси розглядають також з позиції потужних активаторів натуральних кілерів (НК-клітин), які сприяють резистентності організму до пухлинних трансплантатів [167].

Разом з тим, хронічні вірусні інфекції можуть сприяти зниженню імунного статусу організму хазяїна, що супроводжується зростанням його сприйнятливості до інших бактеріальних чи вірусних інфекцій. Так, віруси

імунодефіциту, зокрема вірус імунодефіциту мавп (*Simian Immunodeficiency Virus*), який є збудником СНІДу в резус-макак, здатний сприяти зростанню чисельності кишкового вірому [165].

Існують переконливі докази того, що бактеріофаги можуть взаємодіяти з людською імунною системою [158]. Показано здатність перорально введених фагів транслокуватись *in vivo* до тканин та спонукати імунну відповідь [168]. Тим не менш, механізм, завдяки якому бактеріофаги викликають вроджені противірусні імунні реакції, є досі маловивченим. Встановлено, що динамічна рівновага між віромом та кишковою імунною системою тонко регулюється цитокінами, які секретуються імунними клітинами. Ці клітини здатні розпізнавати антигенні компоненти або патоген-асоційовані молекулярні компоненти [7]. Толл-подібні рецептори (toll-like receptors – TLRs) також виступають у ролі вроджених противірусних імунних сенсорів, як і TLR3, TLR7, TLR8 та TLR9, так само як і RIG-I – цитоплазматична дволанцюгова РНК-геліказа та цитоплазматичний ДНК сенсор – цГМФ-АМФ синтетаза, що в якості месенжерів беруть участь у розпізнаванні вірусної структури. Активація цих рецепторів запускає каскад сигнальних реакцій, які активують транскрипцію ядерних факторів, таких як NF- κ B, IRF3 та IRF7, що, в свою чергу, сприятиме експресії противірусних ефекторів, а саме ІФН-І, прозапальних цитокінів (інтерлейкін-6 та інтерлейкін-1 бета (β)) та хемокінів (інтерлейкін-8 та CXCL-10) [157]. Слід, зазначити, що мишачий ретровірус – збудник пухлини молочної залози (*Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV)), який передається з молоком, використовує вроджені толл-подібні рецептори TLR4, аби викликати толерантність організму до самого себе, і таким чином, уникнути імунної відповіді [169].

Інший механізм, через який бактеріофаги взаємодіють з імунною системою – їх взаємодія з бактеріальним мікробіомом. Сьогодні встановлено, що бактеріофаги модулюють антигенність бактерій шляхом модифікації О-антигенного компоненту ліпополісахариду (ЛПС) у таких мікроорганізмів, як сальмонели, кишкові палички, шигели та холерні вібріони [165, 170].

В наш час показано здатність окремих поверхневих білків фагових капсидів приєднуватись до гліканів, які є одним з основних компонентів муцинових комплексів слизу. За зв'язування муцину з гліканами у фагів відповідають білки, що мають гіперваріабельні домени, які за своєю структурою нагадають імуноглобуліни. Такі білки в капсидах бактеріофагів зустрічаються доволі часто, про що свідчать, зокрема, метагеномні дослідження генетичного матеріалу фагів – мешканців кишківника людини [172]. Спираючись на одержані дані, дослідниками нещодавно запропонована модель, відповідно до якої багатоклітинні організми та фаги коєволюціонували, в результаті чого серед механізмів імунної відповіді на бактеріальні інфекції з'явився «фаговий імунітет», який здатний працювати на слизових оболонках. На думку дослідників, фаги розпочали заселяти слизові оболонки організмів з моменту виникнення слизу в результаті еволюції [173].

Отже, останні дослідження із залученням новітніх технологій дозволяють зробити висновки, що присутність вірусів у здорової людини виходить далеко за межі простого паразитизму, а роль більшості представників людського вірому залишається не з'ясованою. Не виключено, що їх присутність може бути корисною як для самого організму, так і для його мікрофлори, а окремих представників вірому найближчим часом можна буде розглядати з позиції коменсалів. Врешті-решт, межі між патогенними та мутуалістичними вірусами залишаються вкрай мало вивченими, а подальші фундаментальні дослідження в даному напрямку будуть сприяти ширшому розумінню фізіології людини та механізмів формування патологічних процесів.

1.3 Особливості взаємодії вірому з іншими представниками мікрофлори людини

Людський шлунково-кишковий тракт є середовищем для однієї з найскладніших мікробних екосистем. Науковий прогрес з залученням сучасних методів секвенування дозволяє не тільки встановити наявність

вірусних агентів, але й з'ясувати їх вплив на здоров'я людини, зокрема, прояснити патогенез деяких кишкових та позакишкових захворювань [174].

Вірусний компонент мікробіому (віром) з року в рік привертає до себе все більше уваги дослідників. Останні дослідження взаємодії бактеріофагів з мікробіомом мишей показали, що фаги не тільки безпосередньо діють на чутливі бактерії, але й також за допомогою міжбактеріальних комунікацій каскадно впливають на інші види бактерій [175]. Це дає можливість зрозуміти їх екологічну важливість з позиції модуляторів бактеріальної колонізації.

Пізнати функції кишкової мікробіоти і її взаємодію з бактеріальними та фаговими спільнотами допомогла метагеноміка. Зовсім недавно було виявлено, що, наприклад, бактеріофаги біфідобактерій здатні передаватись від матері до дитини, а їх наявність в кишківнику немовляти може розглядатись в якості головного регулятора розвитку мікробіому новонароджених [176]. Наукові джерела також повідомляють про колонізацію кишківнику немовляти бактеріофагами паралельно з бактеріальною мікрофлорою протягом перших днів після народження [54].

Не виключено, що кишкова мікробіота може певним чином впливати на кишковий віром. Сьогодні активно обговорюється питання вірусно-бактеріальних асоціацій. Не зважаючи на розвиток вакцинації і застосування потужних антибіотиків, вірусно-бактеріальні інфекції є основною причиною захворюваності та смертності в усьому світі. Клінічний перебіг таких інфекцій відрізняється глибшими порушеннями в порівнянні із захворюваннями, викликаними окремо вірусами чи бактеріями [177]. Часто клінічна картина інфекційних захворювань в умовах змішаної інфекції різко змінюється, створюючи труднощі при їх діагностиці. При бактеріальних пневмоніях, що викликані гемофільною паличкою, стрептококами або стафілококами, у людини в 50 % випадків виявляють супутні віруси, серед яких превалює вірус грипу [178]. Важливою є роль вірусно-бактеріальних асоціацій у патології шлунково-кишкового тракту [179]. З таких асоціацій найчастіше

зустрічаються асоціації шигел Зонне, ентеропатогенних кишкових паличок з різними кишковими вірусами [180].

В наш час інтенсивно вивчається питання антигенної мімікрії різних біологічних об'єктів, в тому числі вірусних, бактеріальних, паразитарних, вуглеводних рецепторів, пухлинних пептидів. Сьогодні частіше говорять про так звану молекулярну мімікрію, маючи на увазі наявність у різних білкових чи нуклеїнових структур ділянок з однаковими послідовностями амінокислот або нуклеотидів [181]. Вивчення феномену антигенної мімікрії є новим стратегічним напрямком в питанні розробки сучасних імунобіологічних препаратів. Недавно показано здатність деяких видів мікроорганізмів бактеріальної природи продукувати вуглеводні біополімерні мімікрини, антигенно близькі до пептиду p17 ВІЛ, які пригнічують репродукцію ВІЛ [182]. Разом з тим, вплив мікроорганізмів бактеріальної природи на новий коронавірус SARS-CoV2 зараз лише починає інтенсивно вивчатись [183].

Питання вірусно-бактеріальних асоціацій не є новим для медичної мікробіології. Ще в середині минулого століття Г.К. Бургвіц (1937) показав здатність дріжджових клітин під впливом вірусу змінювати свої морфологічні і фізіологічні властивості. В свою чергу, віруси під впливом бактерій теж змінюють свої властивості. Показано, що в культурах клітин комбінація вірусу і бактерій викликає більш виражений цитопатогенний ефект, ніж моноінфекція вірусами або бактеріями [184]. Аналогічний результат досягається при інфікуванні культури перещеплених клітин аденовірусом за три години до внесення шигел та при інфікуванні клітин вірусом грипу з наступним (через 24 години) внесенням стафілококу [185].

Відомо про властивість бактерії під дією вірусів набувати здатності проникати в цитоплазму і навіть в ядро клітини [186]. Це явище дослідники інтерпретують як зростання вірулентності бактерій в умовах змішаних інфекцій. Хоча інші автори вважають, що в даному випадку слід казати не про зростання вірулентності, а про зміну властивостей самої еукаріотичної клітини по відношенню до бактерій [187]. Описано збільшення адсорбційних

властивостей еукаріотичних клітин відносно бактерій при їх попередньому інфікуванні вірусом [188]. Припускають, що це відбувається за рахунок зміни рецепторної структури їх мембрани під дією вірусів. Висловлено припущення про здатність вірусних глікопротеїдів, які вбудовуються в мембрану еукаріотичної клітини, слугувати рецепторами для бактеріальних клітин [189].

Дуже цікавим і важливим для практичної охорони здоров'я є ступінь прояву вірулентних властивостей збудників в умовах змішаної інфекції. Посилення патогенної дії було неодноразово показано в досліджах, спрямованих на визначення вірулентності. Так, у стафілококів, виділених з культури клітин, інфікованої одночасно вірусами грипу, помічено зростання дерматонекротичних властивостей [190]. Описано також стимулюючий вплив вірулентних стафілококів на репродукцію вірусу грипу. Автори пов'язують це з руйнуванням клітин стафілококами, в результаті чого прискорюється вихід віріонів грипу з клітин [185].

З іншого боку, деякі вірулентні штами бактерій, на відміну від авірулентних, навпаки, можуть мати інгібуючий вплив на репродукцію вірусів в перещеплюваних клітинних культурах. Подібний ефект пов'язують із швидко наступаючою деструкцією клітин моношару за рахунок цитопатичної дії бактерій, що перериває цикл розвитку вірусів в інфікованій клітині [191]. У вірусу грипу після взаємодії з *S. aureus* вдвічі зростає здатність до аглютинації еритроцитів, а також пришвидшується час розвитку ЦПД [192]. Помічено також, що при відсутності вірусу грипу *S. aureus* в культурі клітин росте значно гірше, а його фактори патогенності проявляються помітно слабше [193]. Описано важливу роль асоціації респіраторних вірусів та бактеріальних патогенів (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* і *Moraxella catarrhalis*) у патогенезі середнього отиту [194].

Цікавими є експериментальні праці про взаємодію мікоплазм та онковірусів, в яких досліджено їх асоціації на моделі перещеплюваних клітин [195, 196]. Дослідниками показано, що *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis* виявляються переважно в тих міжклітинних просторах, де

сконцентровані найбільші скупчення віріонів BLV (*bovine leukemia virus*). Зареєстровано феномен адсорбції віріонів на поверхні мікоплазм. Встановлено здатність онковірусів типу С і D адсорбуватися на поверхні бактеріальних клітин (*S. typhi*, *E. coli*, *M. tuberculosis*) та показано зростання репродукції онковірусів в перещеплюваних клітинах L929 при їх взаємодії з *M. tuberculosis*. Дослідники описують особливості взаємодії таких асоціантів з еукаріотичними клітинами: фагоцитоз бактерій з адсорбованими на них віріонами і подальше формування фагосом, що містять як бактерії, так і віруси [187]. В цілому вірусно-бактеріальні асоціації характеризуються взаємним посиленням факторів патогенності обох мікроорганізмів, що може сприяти формуванню дисбіотичних порушень з домінуванням патогенної мікрофлори та розвитком бактеріальних ускладнень [197].

Симбіоз вірусів та бактерій може мати різні наслідки для гомеостазу організму хазяїна та впливати на характер перебігу інфекційного процесу. При комплексній оцінці мікрофлори з використанням ГРХ отримано дані, які корелюють з патогенетично обумовленими особливостями клінічної картини вірусних і бактеріальних кишкових інфекцій. Так, при бактеріальних ГКІ внаслідок інвазії збудника виникає запальний процес у слизовій оболонці товстої кишки з пригніченням метаболічної активності більшості мікроорганізмів. На відміну від бактеріальних, при вірусних ГКІ патологічний процес захоплює верхні відділи ШКТ і тонкий кишківник з розвитком ферментопатії (дисахаридазна недостатність) [198].

Останніми роками описано формування значних змін мікрофлори декількох біотопів організму (кишківника, ротоглотки, носа, сечовивідних шляхів) при гострих і хронічних вірусних гепатитах [199]. Але, ключове питання полягає в тому, чи впливає мікробіом на вірусну реплікацію в шлунково-кишковому тракті, змінюючи тим самим патогенність вірусу? Дослідниками з США показано зниження сприйнятливості до поліовірусу у мишей після лікування антибіотиками, вірусна репродукція за таких умов в кишківнику була мінімальною. Експериментальні дослідження дали змогу

встановити, що присутність в середовищі бактерій, у яких є поверхневі полісахариди (або їх N-ацетилглюкозаміни), в тому числі ліпополісахариди і пептидоглікан, підвищує інфекційність вірусу поліомієліту. При цьому не виключається можливість зв'язування вірусу поліомієліту з бактеріальним ліпополісахаридом. В результаті такого процесу зростає чутливість клітин господаря до інфекційного агенту [12, 14].

Взагалі, питання збереження інфекційності ентеровірусів та вивчення факторів, які на це впливають, вже тривалий час одними з ключових питань сучасної вірусологічної науки, яке набуває особливого значення при оцінці епідемічної небезпеки їх поширення. Ентеровірусам в цілому притаманна значна стійкість до дії несприятливих фізичних та хімічних факторів. Питання стійкості особливо актуальне у зв'язку з тим, що віруси, завдяки своїм біологічним особливостям (внутрішньоклітинні паразити), не розмножуються у зовнішньому середовищі, а тільки перебувають у ньому. Резистентність ентеровірусів залежить від багатьох чинників, передусім від біологічних властивостей видів та штамів вірусів. Припускають, що білкові компоненти та бактеріальна мікрофлора є найбільшим стабілізуючим чинником, який сприяє повільнішій інактивації ентеровірусів та їх довшому збереженню в навколишньому середовищі [200]. Разом з тим, результати досліджень переконливо демонструють різну стабільність вірусних популяцій в межах виду [201]. Зокрема, існуючі субпопуляції – бентонітові варіанти ентеровірусів з високими сорбційними властивостями (генетичний варіант $A_{\text{бент}}^+$) здатні довше зберігатись за рахунок присутності на поверхні залишків клітин хазяїв [202].

Цікаві результати були отримані при дослідженні впливу бактеріальних клітин на інфекційність реовірусів – вірусів, здатних вражати багатьох ссавців, в тому числі й людину [203]. Автори відмічають зростання важкості клінічного перебігу реовірусних інфекцій за умов присутності кишкових бактерій: мишам, пролікованим та нелікованим антибіотиками, паралельно вводили реовірус. Фекалії нелікованих мишей були жовтими, жирними, твердими –

типовими для біліарної обструкції, на противагу цьому, фекалії пролікованих мишей виглядали нормально. Титри реовірусів в кишківнику нелікованих мишей були значно вищими, ніж у пролікованих антибіотиками [13]. Ці результати дають підстави також припустити, що кишковий мікробіом може сприяти розвитку інфекцій вірусної етіології.

Існують повідомлення про здатність антибіотикотерапії інгібувати ротавірусну інфекцію та підсилювати специфічний імунітет. Авторами продемонстровано гальмування прогресування ротавірусної інфекції та зниження інфекційності ротавірусів на 42% після елімінації мікробіоти [204]. Інші дослідники стверджують, що виснаження мікрофлори за допомогою антибіотиків в рази зменшує частоту інфікування кишковими вірусами [14]. На думку авторів, зростання реплікації поліовірусу може бути пов'язане з властивостями мікробіому організму хазяїна, впливом вірусу, або тим та іншим. Результати експериментів свідчать про інтенсивну взаємодію вірусу зі специфічними бактеріальними ліпополісахаридами. Така взаємодія підвищує вірусну термостабільність і є потужним стимулятором інфекційності, зокрема поліовірусів [13, 14]. В літературі описано можливість кишкових мікроорганізмів стимулювати вилуплення яєць нематод в шлунково-кишковому тракті мишей. Це підтверджує думку про те, що різні патогени можуть використовувати мікробіоту для свого розмноження [205].

Відомі наукові праці, в яких йдеться про ефективність використання антибіотиків у боротьбі з норовірусом – РНК-вмісним вірусом, який часто є причиною епідемій шлунково-кишкових захворювань небактеріальної природи. Так, дослідники з Вашингтонського університету показали здатність антибіотиків інгібувати розвиток інфекційного процесу, викликаного норовірусом [206]. На думку дослідників – для подальшого розвитку запальної реакції в кишківнику норовірус потребує взаємодії з певними бактеріями. Дослідниками показано не здатність норовірусів до репродукції в організмі тварин, які раніше пройшли антибіотикотерапію. На думку авторів, загибель бактеріального «партнера» в результаті впливу антибіотиків може запобігти

розвитку вірусної інфекції у тварин. Отже, не виключено, що вірус здатен встановлювати «симбіотичні» відносини з бактеріями і такий симбіоз сприяє розвитку запальної реакції в кишківнику [207].

Очевидно, кишкові мікроорганізми здатні суттєво впливати на фізіологічні процеси в макроорганізмі. Водночас там, де спостерігається виражена симбіотична функція синантропних бактерій, роль вірусів, присутніх у шлунково-кишковому тракті, є абсолютно не дослідженою. Разом з тим, сьогодні описано здатність РНК-вмісного кишкового вірусу замінити важливі функції синантропних бактерій в кишківнику. Так, інфекція норовірусом (MNV) у мишей, які пройшли курс лікування антибіотиками, сприяє відновленню клітин кишківника і функції лімфоцитів без розвитку характерного запалення та інфекційного процесу [162]. Присутність мишачого норовірусу також пригнічує поділ незрілих лімфоїдних клітин, що спостерігається при відсутності бактерій, та індукує транскрипційні зміни в кишківнику, пов'язані з розвитком імунітету і активацією сигнальної системи інтерферону 1 типу.

В літературі описано здатність норовірусної інфекції компенсувати шкідливий вплив лікування антибіотиками у випадках із травмами кишківника та патогенними бактеріальними інфекціями [162]. На думку авторів, віруси можуть підтримувати гомеостаз та формувати імунітет слизової оболонки кишківнику, подібно до синантропних бактерій. Іншими авторами показано, що індуковану норовірусом кишкову патологію у мишей, які отримували декстран сульфат натрію в питній воді або при пероральному інфікуванні *Citrobacter rodentium*, можна ефективно запобігти, використовуючи антибактеріальні препарати [208, 209]. Дослідники переконливо доводять залежність інтенсивності репродукції норовірусів від присутності бактерій [210]. Існують також наукові дані, які демонструють зниження імунітету до норовірусів при глистяних інвазіях [211].

Прикладом непрямого сприятливого впливу мікрофлори на реплікацію вірусу є спричинення вірусної інфекції шляхом стимуляції проліферації або

активації клітин-мішеней. Це, зокрема, стосується ретровірусів, які націлені на проліферуючі клітини. Наприклад, миші-гнотобіонти, інфіковані вірусом лейкемії мишей, відносно стійкі до вірус-індукованих лейкемій порівняно зі звичайними мишами, які не мають специфічного патогену (specific pathogen free (SPF) mice) [212, 213]. З іншого боку, є дані, що безмікробні миші, навпаки, є більш сприйнятливими до вірусу лейкемії мишей, ніж SPF миші [214]. Вважають, що дослідження, які показують підвищену сприйнятливість до вірусу у стерильних мишей, були проведені до того, як виявлено присутність в деяких ізолятах лактатдегідрогеназного вірусу, він активує системні лімфоцити і може спотворити результати досліджень [215].

Відомі наукові праці, в яких йдеться про зниження частоти виділення ентеровірусів, норовірусів та реовірусів в осіб з вираженим дисбіозом на фоні ВІЛ/СНІД [216]. При дослідженні фекалій ВІЛ-інфікованих дітей вчені дійшли до висновку, що кишкові віруси не є причиною розвитку діареї у таких хворих [217]. Сьогодні навіть існує гіпотеза про можливість кишкового вірусу бути прогностичним показником прогресування ВІЛ - інфекції [218]. Разом з тим, попри те, що при ВІЛ - інфекції спостерігається виражений дисбіоз, роль мікробіоти в патогенезі ВІЛ є поки що не дослідженою [219].

ВІЛ здатен передаватись через пошкоджені слизові оболонки, багаті на нормальну мікрофлору. Виникає питання: чи сприяє мікрофлора інфікуванню ВІЛ? Останні дослідження показали, що особи, інфіковані ВІЛ, мають підвищений рівень ЛПС у плазмі [220]. Більш того, пептид, отриманий з петлі V3 gp120 вірусів специфічно реагує з ліпідом А фрагменту ЛПС, як і повний gp120 білок [221]. Доведено також, що гліцерол монолаурат, широко використовуваний антимікробний компонент, захищає резус-макак від вірусу імунодефіциту мавп (ВІМ) [222]. Тому дослідники не виключають, що віруси імунодефіциту людини та віруси імунодефіциту мавп можуть також використовувати синантропні бактерії, аби забезпечити собі успішну дисемінацію та репродукцію [223].

Концепція впливу вірусів на схильність господаря до розвитку соматичної патології підтверджується також експериментами, в яких показано здатність вірусу лімфоцитарного хоріоменінгіту гальмувати розвиток діабету у мишей [224]. В подальшому подібні результати були отримані іншими дослідниками, які здійснювали моделювання даної патології на тваринах [6, 225].

Отже, на противагу вже відомої користі, яку несе нормальна мікрофлора господареві, віруси можуть використовувати кишкову мікрофлору як тригер для реплікації на оптимальній ділянці. Останні дослідження дають підстави вважати, що пригнічення нормальної мікрофлори антибіотиками може мати противірусний ефект [227]. Таким чином, роль коменсальних бактерій у вірусній передачі та/чи патогенезі тільки починає прояснятися. Очевидно, кишкова мікрофлора може сприяти вірусній репродукції, а використання мікрофлори хазяїна може розглядатися як інноваційна стратегія «ухиляння», яка використовується вірусами.

Разом з тим, відомі праці, в яких йдеться про захисну роль кишкової мікробіоти у патогенезі вірусних інфекцій.

Оскільки мікрофлора присутня в місцях проникнення вірусів в організм хазяїна, вона може потенційно змінити результат перебігу інфекції. Наприклад, мікрофлора комах роду *Aedes aegypti* опосередковано зменшує передачу вірусу Денге [7]. Крім того, в експериментах на мишах-гнотобіонтах показано, що без попередньої оральної аплікації ентерококів попадання таких тварин в звичайні умови призводить у них до розвитку летальної вірусної інфекції. Автори припускають, що ендогенна бактеріальна флора стимулює противірусну імунну систему комарів шляхом активації базального рівня вроджених імунних відповідей. Іншими дослідниками переконливо показано зростання сприйнятливості мишей до вірусу грипу А після формування у них вираженого антибіотикоіндукованого дисбіозу [226]. Особливо інтенсивно сьогодні вивчається питання впливу мікробіому людини на репродукцію нового вірусу SARS-CoV2 [183]. Не виключено, що використання деяких

видів мікроорганізмів – представників нормальної мікрофлори людини в якості допоміжної терапії буде ефективним для профілактики і /або лікування COVID-19.

Отже, розуміння того як мікробіом здатен впливати на розвиток вірусних захворювань може ініціювати впровадженню нових ефективних противірусних стратегій. Разом з тим, для повного аналізу особливостей взаємозв'язку між вірусами і бактеріями під час розвитку інфекційного процесу, а також відповіді на питання, чи можуть інші вірусні та бактеріальні агенти утворювати своєрідний симбіотичний зв'язок в організмі людини, необхідні подальші дослідження.

1.4 Нові підходи до моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин

До актуальних проблем клінічної медицини та медичної мікробіології належать діагностика та корекція дисбіозу шлунково-кишкового тракту. Дисбіози людини є одним з найбільш поширених патологічних станів серед населення України [1, 2, 228]. Проблема порушення складу кишкової мікрофлори набула особливої значущості у зв'язку із зростанням хронічних захворювань органів травлення, а також широкого застосування антибіотиків.

Для більш адекватної корекції дисбіотичних порушень у кишківнику людей доцільно в експерименті на лабораторних тваринах виявити фактори і умови, що сприяють формуванню такого стану.

З метою вивчення характеру змін, складу і властивостей кишкової мікрофлори, а також для обґрунтування раціональних підходів корекції мікроекологічних порушень, необхідна розробка адекватної моделі. Це тим більш важливо з огляду на те, що отримані в експерименті на лабораторних тваринах результати можна в подальшому певною мірою екстраполювати на організм людини як у плані профілактики, так і лікуванні дисбіотичних станів [229]. На сьогодні в науковій літературі існує вкрай мало інформації щодо можливості ефективного і адекватного відтворення дисбіозу кишківника у

лабораторних тварин, хоча ряд дослідників при виконанні експериментів на лабораторних тваринах спостерігали у них прояви такого стану.

У створенні моделі дисбіотичних порушень на лабораторних тваринах використовувались різні підходи. Так, описано можливість формування експериментального дисбіозу у білих мишей шляхом їх радіоактивного опромінення в дозі 700 рентген [230]. Інші дослідники доводять ефективність розвитку експериментального постінфекційного дисбіозу у тварин (мишей лінії СВА і кролів Шиншил) в результаті підшкірного введення їм великих доз (2×10^9 мікробних клітин) стафілококів [231]. За таких умов зафіксовано розвиток маніфестної форми дисбіозу у піддослідних тварин з вираженими змінами в якісному і кількісному складі кишкової мікрофлори - як при експериментальній променевої хворобі, так і при підшкірному введенні стафілококів. Проте, слід відмітити, що в обох випадках опромінені та інфіковані стафілококами тварини гинули, що не дозволяє в динаміці вивчати відновлення нормальної кишкової мікрофлори і оцінювати ефективність того чи іншого підходу в лікуванні індукованого дисбіозу кишківника піддослідних тварин. До того ж, робота на установках для опромінення лабораторних тварин може бути небезпечною для самих дослідників.

У літературі описано можливість лабораторного моделювання дисбіотичних станів кишківника у мишей лінії BALB/c, зокрема, формування у них системного кандидозу в результаті введення потужних доз імуносупресантів. В якості імуносупресантів було використано гідрокортизон [232]. Описані способи моделювання дисбіозу у білих щурів шляхом ентерального введення по 0,3 г (0,015 мг/г ваги) сарколізину протягом двох днів, після чого дослідники пропонують вводити ентерально суміш антибіотиків бензилпеніциліну та канаміцину сульфату по 200 мг щоденно протягом 3-х днів [233]. Деякі вчені для моделювання дисбіотичних порушень у щурів пропонують використовувати комбінацію тетрахлорметану та рифампіцину [234]. Крім того, перспективним, на наш погляд, є процес

моделювання первинного дисбіозу у тварин є використанням ацетамінофену в дозі 750мг/кг маси тіла протягом 5 діб [235].

Описано спосіб моделювання дисбіозу у білих мишей шляхом видалення у них тимусу [236]. За результатами таких експериментальних досліджень вдалося встановити, що видалення даного органу викликає виражені порушення у співвідношенні мікроорганізмів – представників нормальної мікрофлори. Такі порушення характеризувались в цілому зниженням кількості нормальної мікрофлори з одночасним збільшенням умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів. Інші дослідники радять доповнювати видалення виличкової залози у щурів попереднім проведенням анестезії гексеналом у дозі 125 мг/кг маси, а для прискорення формування дисбіотичного стану піддослідних тварин пропонують поміщати в ізолятор з вмістом у повітрі 20% вуглекислоти (CO₂) [237].

Сьогодні дослідники найчастіше пропонують використовувати спосіб моделювання дисбіозу кишківника у лабораторних тварин шляхом впливу антибактеріальних препаратів на кишкову мікрофлору та з подальшим визначенням кількості життєздатних мікроорганізмів на початку та наприкінці дослідження [238, 239]. Серед багатьох факторів, які призводять до формування і розвитку дисбіозів кишківника, антибактеріальна терапія відноситься до однієї з провідних причин, оскільки антибіотики і хіміотерапевтичні препарати є основними препаратами терапії інфекційних захворювань бактеріальної природи, що викликають якісні та кількісні порушення нормальної мікрофлори в кишківнику. Внаслідок неконтрольного використання антибіотиків часто відмічається загибель не тільки патогенних мікроорганізмів у природних біотопах, а й представників нормальної мікрофлори людини.

Модифікацій моделювання дисбіотичних станів у лабораторних тварин з використанням антибактеріальних препаратів є десятки. В основному методологічні особливості обмежуються вибором антибактеріального препарату. В переважній більшості дослідники зупиняються на таких

препаратах, як ампіцилін та лінкоміцин, які здатні ефективно спровокувати формування дисбіозу у щурів віком 60-90 діб [239, 240]. Деякі автори демонструють можливість ефективного моделювання дисбіозу на статевозрілих білих лабораторних щурах-самцях лінії Вістар (маса тіла 200–250 г) шляхом щоденного (протягом трьох діб) введення ампіциліну та метронідазолу [238]. Інші дослідники з метою моделювання первинного дисбіотичного стану мишам вводили внутрішньошлунково суміш антибіотиків тетрацикліну і канаміцину протягом 14 днів щодня в дозі 250 мг/кг [241].

Для моделювання дисбіотичних порушень запропоновано також використовувати гентаміцин шляхом перорального введення лабораторним тваринам (1 раз на добу протягом 5 днів у дозах, що перевищують його добову терапевтичну дозу при парентеральному введенні більш ніж в 4-8 рази у мишей і в 4 рази - у морських свинок) [242]. На думку дослідників, введений за таких умов гентаміцин матиме місцеву дію на пристінкову та просвітну мікрофлору і з часом буде здатний викликати дисбіотичний стан кишківника тварин. Цей стан може бути визначений як за аналізом загального вмісту мікрофлори в перерахунку на 1 г фекалій, так і вмісту окремих її представників, зокрема біфідобактерій, лактобактерій та ешерихій.

Отже, аналіз літературних даних демонструє існування різних підходів до моделювання дисбіозу у лабораторних тварин. Разом з тим, існує низка факторів, які можуть спотворювати результати таких експериментів. Враховуючи стрімкий розвиток вчення про нормальну мікрофлору, використання нових пробіотичних мікроорганізмів та тестування створених на їх основі пробіотиків, найближчим часом нагальним завданням сучасної мікробіології має стати розробка оптимальних методів формування дисбіозу у лабораторних тварин та їх стандартизація.

Висновки до розділу 1

У розділі охарактеризовано сучасний стан проблеми дисбіотичних порушень серед населення України та світу. Наданий аналіз досягнень в галузі

вивчення мікробіому людини. Представлені сучасні дані про функції симбіотичної мікрофлори людини та її роль в підтриманні здоров'я. Охарактеризовано сучасні засоби, що використовуються для профілактики та лікування порушень мікробіому.

За результатами аналізу літературних джерел можна стверджувати, що в кишківнику людини та в інших системах організму присутні численні вірусні популяції. Поряд з цим, вплив бактерій на кишкові віруси залишається не дослідженим, як і невідомою залишається роль мікробіоти у патогенезі інфекцій вірусної етіології загалом. Розуміння ролі цих популяцій в нормі та при патології вимагає значно глибшого вивчення їх складу та особливостей взаємодії з мікробіотою.

Літературні джерела підтверджують, що кишкова імунна система існує в безперервній і динамічній рівновазі з усіма компонентами кишкового мікробіому та вірому. Цілком ймовірно, що взаємодія між ними може вплинути на здоров'я і захворюваність хазяїна шляхом безпосередньої модуляції імунної системи.

З кожним роком зростає кількість публікацій, у яких показано, що кишкова мікробіота може певним чином впливати на кишковий віром. Сьогодні активно обговорюється питання вірусно-бактеріальних асоціацій, які є ваговою причиною захворюваності та смертності в усьому світі. Подальші дослідження в даному напрямку, безсумнівно, відкриють нові можливості для лікування інфекційних захворювань, а розуміння того, як мікробіом може сприяти вірусному захворюванню, може ініціювати впровадження нових ефективних противірусних стратегій..

В огляді літератури також представлені сучасні дані про моделювання дисбіозу кишківника на лабораторних тваринах. Описані методики дозволять вирішити конкретні наукові завдання, пов'язані зі з'ясуванням ролі ентеровірусів у розвитку порушень кишкового мікробіоценозу та науковим обґрунтуванням шляхів корекції складу нормальної мікрофлори кишківника з

урахуванням вірусного фактору, а також оцінити терапевтичну ефективність нових пробіотичних мікроорганізмів та створених на їх основі препаратів.

Існуючі теоретично-концептуальні положення, проаналізовані в даному розділі, наведено у наступних публікаціях:

1. Ентеровіруси: проблеми на шляху ерадикації поліомієліту/ В. П. Широбоков, В. І. Задорожня, О. І. Євтушенко, В. В. Бобир, Л. М. Гриценко // Сучасні інфекції. 2008. №3. С. 61-70.

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

3. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Широбоков В. П. Кишковий віром та нормальна мікрофлора: особливості взаємодії. Аналі Інституту Мечнікова. 2015. №2 . С. 25-29.

4. Бобир В. В. Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Широбоков В. П. Способи моделювання дисбіотичних порушень на лабораторних тваринах. Biomedical and Biosocial Anthropology. 2015. № 26. С. 230-233.

5. Бобир В. В. Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Широбоков В. П. Нові дані про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування. Вісник морфології. 2015. №2. Т. 21. С. 531-537.

6. 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).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

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 МОЗ України.

Для вирішення поставлених завдань було виконано перспективне дослідження закономірностей поширення ентеровірусів у різних категорій осіб з дисбіозом кишківника, з'ясовано особливості ізоляції ентеровірусів від осіб з дисбіозом та їх видової ідентифікації, в тому числі і електронно-мікроскопічної верифікації. Розроблено ефективний спосіб моделювання дисбіозу у лабораторних мишей та порівняльно вивчено можливість моделювання ентеровірусних інфекцій на фоні дисбіотичних станів. Досліджено ефективність використання пробіотичних препаратів та сорбентів для профілактики дисбіотичних порушень у мишей з урахуванням вірусного фактору.

Досліди виконані згідно із загальними етичними принципами, що засвідчено висновками комітету з біоетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (протокол №133 від 12 червня 2020 р.).

2.1 Матеріали

2.1.1 Культури клітин

В процесі виконання експериментальних досліджень використано нижче перелічені перещеплювані культури клітин:

HEp-2 – лінія клітин, отримана з епідермоїдної карциноми людини;

RD – культура клітин, що походить із рабдоміосаркоми ембріону людини;

L20B – лінія мишачих L-клітин, яким за допомогою методів генної інженерії надано здатність експресії рецепторів до поліовірусів;

Vero – культура клітин, отримана з нирки африканської зеленої мавпи.

Культури клітин зберігали у рідкому азоті в кріолабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця протягом усього періоду експериментальних досліджень.

2.1.2 Віруси

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. Уся експериментальна робота з вакцинними штамами поліовірусів 2 та 3 типу проводилась до введення в дію Наказу МОЗ України № 237 від 24.03.2016 року «Про деякі питання застосування вакцини для профілактики поліомієліту», який передбачає заборону використання вказаних серотипів в наукових дослідженнях. Усі зразки клінічних ізолятів вірусів поліомієліту 2 типу були знищені шляхом автоклавування у лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця (акт №1, від 04.05.2016 р.).

У кожного з використаних у дослідженнях штамів вірусів є паспорт. Всі зазначені штами вірусів знаходяться у музеї кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

2.1.3 Експериментальні тварини

Експерименти проводились на мишах лінії *BALB/c* та безпородних білих мишах. Всього в дослідженнях було використано 870 мишей, що розведені у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Тварини утримувалися у відповідності з «Санітарними правилами щодо устрою, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)», на стандартному раціоні, що складався із гранульованого комбікорму для лабораторних тварин (рецепт ПКп 1-24). Склад комбікорму: зернові та бобові культури, макуха, дріжджі кормові, сухе молоко, рибне борошно, премікс, крейда та сіль. Доступ до води був вільний. У контрольній групі тварин використовували звичайну питну воду централізованого водопостачання.

В кожній з полікарбонатних кліток розміром 325x215x85 мм з кришками з оцинкованої сталі і скляними поїлками для води утримувалось по 10 тварин (8 особин жіночої статі, дві особини чоловічої статі). Для підстилки використовували тирсу листвяних порід дерев (не хвойні рослини).

В приміщенні для утримання тварин підтримувались наступні умови: температура + 20-24°C, вологість – 30-60%, 12-годинний світловий день.

Всі роботи з тваринами проводились у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» і у відповідності з «Етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами» від 21.02.2006 № 3447-IV, «European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes» та «Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes».

Деякі серотипи вірусів Коксакі культивували в організмі безпородних новонароджених білих мишей.

2.2 Методи

2.2.2 Культивування культур клітин

Для культивування культур клітин (RD, Vero, HEp-2, L20B) використовували спеціальні пластикові флакони та планшети або посуд із нейтрального скла, а також пробірки та «пеніцилінові» флакончики. На початку роботи з культурою клітин їх поміщали в ростове середовище, яке складалося з 90% мінімального поживного середовища Ігла (на розчині Ерла) або середовище 199 та 10% телячої ембріональної сироватки крові (Sigma). Після формування моношару клітин ростове середовище змінювали на середовище підтримки (середовище Ігла, середовище 199 або інше середовище з 1-2% телячої ембріональної сироватки). Застосовували в основному сироватку крові ембріонів ВРХ, оскільки вона сприяє росту клітин та не містить інгібіторів. При використанні сироватки іншого походження проводили перевірку на наявність в ній інгібіторів вірусів. В цілому методика вирощування культур клітин не відрізнялась від загальноприйнятої [243].

2.2.3 Підготовка матеріалу для вірусологічних досліджень

Матеріалом слугували фекальні маси людини та тварин (білих мишей). Їх відбирали у стерильні скляні флакончики. Далі переводили у суспензію за допомогою розчину Хенкса або фосфатно-сольового розчину у співвідношенні 10 мл на 1 грам матеріалу. Пробірку закривали та інтенсивно струшували до гомогенізації зразку. Центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хв за температури 4°C. Надосадову рідину деконтамінували за допомогою антибіотиків (2000 ОД пеніциліну та стрептоміцину на 1 мл) або хлороформу (0,5 мл на 10 мл досліджуваної рідини). Хлороформ руйнує бактерії, гриби та цитотоксичні ліпіди, при цьому відбувається роз'єднання вірусних агрегатів. Найчастіше поєднували обидва методи.

Освітлену рідину зберігали при температурі -20°C . Перед дослідженням суспензію розморожували та ще раз центрифугували при 3000 об/хв протягом 5-10 хв.

2.2.4 Виділення вірусів у культурі клітин

Зразки, в яких передбачалась присутність поліовірусу, тестували на лініях клітин: L20B, HEp-2, RD, Vero.

Клітини L20B чутливі до поліовірусів, останні викликають в них характерний цитопатогенний ефект (ЦПЕ). Деякі віруси людини (зокрема, аденовіруси і реовіруси) можуть викликати ЦПЕ в цих клітинах, проте він значно відрізняється від того, що викликається поліовірусом. Небагато неполіомієлітних ентеровірусів (наприклад, Коксакі А) можуть розмножуватися в клітинах L20B (іноді тільки після культивування на іншій лінії клітин) і викликати типову для ентеровірусів цитопатогенну дію (ЦПД).

RD - клітини, одержані з рабдоміосаркоми ембріону людини.

Використання цих двох ліній для лабораторної діагностики поліомієліту забезпечує високу чутливість і специфічність при виявленні поліовірусу, допомагає стандартизувати методику і порівнювати результати, одержані в різних лабораторіях.

У клітинах HEp-2 розмножуються поліовіруси і віруси Коксакі В, викликаючи ЦПД.

Під час виконання даного фрагменту роботи постійно проводили стеження за чутливістю клітин до поліовірусів, періодично проводячи титрування референс-штамів вакцинних поліовірусів. Контаміновані мікоплазмами клітинні матеріали знищували автоклавуванням.

Роботу з виділення ентеровірусів проводили у відповідності до методичних рекомендацій [244].

При появі характерної для ентеровірусів цитопатогенної дії – закруглені, заломлюючі світло клітини, що відшаровуються від ростової поверхні вірусологічного матрацу або лунки, продовжували інкубацію до розвитку ЦПД в 75% клітин (три «плюси» ЦПД) і зберігали пробірку при -20° С для другого пасажу. Матеріал другого пасажу використовували для типування вірусу і проведення внутрішньотипової диференціації (ВТД).

У тому випадку, якщо ЦПД не виявилася протягом 7 днів, проводили один "сліпий" пасаж і спостерігали культури ще 7 днів. Вміст окремих пробірок одного пасажу не змішували, а інокулювали окремо.

«Сліпий» пасаж проводили також, якщо через 5-7 днів у дослідних і контрольних пробірках з'являлися ознаки старіння клітин або дегенерації. Такі пробірки з матеріалом проби заморожували при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, відтаювали і переносили по 0,2 мл культуральної рідини у пробірки зі свіжою культурою тих же клітин, далі культури спостерігали протягом 7-10 днів. При відсутності цитопатогенної дії результат дослідження вважали негативним.

При позитивному результаті (наявність цитопатогенної дії) у клітинах RD, але негативному в клітинах L20B після 14 днів спостереження, проводили повторний пасаж на клітинах L20B.

2.2.5 Культивування ентеровірусів у новонароджених мишах

При виділенні вірусів з новонароджених мишей-сисунців, матеріалом для дослідження слугував їх м'язово-кістковий комплекс. Матеріал зважували та розтирали в стерильній ступці з додаванням стерильного піску та отримуючи суспензію в ДМЕМ з антибіотиками (на 100 мг матеріалу – 1 мл середовища). Далі тричі здійснювали заморожування-розморожування матеріалу з подальшим його центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хв. Для роботи використовували надосадову рідину. Концентрацію вірусів визначали шляхом титрування мікрометодом у культурі клітин за TCID_{50} .

2.2.6 Одержання гелю бентоніту

За основу для приготування гелю природного сорбенту бентоніту було взято загальноприйняту методику, яка розроблена академіком Ширококовим В.П. [245]. Запропонована нами методика приготування гелю бентоніту дещо відрізнялась від класичного методу і дозволяла отримати максимально очищений сорбент. Спосіб здійснювали таким чином: сухий бентоніт диспергували у дистильованій воді і переводили його у натрієву форму додаванням до отриманої суспензії розчину вуглекислого натрію. Суміш витримували не менше 24 годин при кімнатній температурі, нагрівали до t

100°C, витримували при цій температурі протягом 1 години при періодичному помішуванні, центрифугували 10 хв при 1000-2000 об/хв. Видаляли прозору надосадову рідину, що містила надлишок вуглекислого натрію і розчинені в воді сторонні речовини. Осад суспензували у потрібному об'ємі дистильованої води і центрифугували у тому ж режимі. Процедуру повторювали тричі. При цьому друге і третє центрифугування проводили при 2000-3000 об/хв. протягом 15-20 хв із видаленням нижньої частини осаду забруднюючого компоненту сірого кольору. Осад, що залишився, заливали 20 об'ємами дистильованої води і гомогенізували, центрифугували 10 хв при 2000 об/хв., видаляли прозору надосадову рідину та найнижчу частину осаду, яка складається з забруднюючих речовин. Навколоосадову рідину й осад молочно-жовтого кольору переносили у мішалку і суспендували протягом 20-60 хвилин в 0,14 М розчині хлористого натрію. Суспензію центрифугували при 3000 об/хв. протягом 30 хв. Прозору надосадову рідину зливали, саму нижню частину осаду сірого кольору видаляли, навколоосадову рідину молочно-жовтого кольору і осад молочно-жовтого кольору, які переважно складаються з бентоніту, переносили у мішалку, де змішували із рівним об'ємом 0,14 М розчину хлористого натрію і суспендували. Далі суспензію перемішували протягом 20 хв і центрифугували при 3000 об/хв протягом 30 хв. Прозору надосадову рідину зливали, осад молочно-жовтого кольору знову суспендували у рівній кількості 0,14 М розчину хлористого натрію і перемішували протягом 20 хв. Процедуру з очищення і виділення дрібнодисперсної фракції проводили тричі. Потім надосадову рідину зливали, а до отриманого осаду молочно-жовтого кольору, що є дрібнодисперсною фракцією бентоніту, додавали бідистильовану воду із розрахунку одержання гелю бентоніту з концентрацією сухих речовин 5-6%.

Сухий залишок сорбенту бентоніту в одержаному гелі визначали після його висушування в сухожаровій шафі при 105°C. Як правило, використовували 5-6 % суспензію бентоніту. Стерилізували сорбент автоклавуванням протягом 40 хвилин при 0,5 атм.

2.2.7 Дослідження маркерів вірулентності ентеровірусів

2.2.7.1 Визначення бентонітового маркеру

Бентонітовий генетичний маркер ентеровірусів визначали за їх здатністю до адсорбції на бентоніті при слаболужних рН [141]. У вірусомісну рідину додавали 5% гель бентоніту до кінцевої концентрації близько 0,05-0,1% за вмістом сорбенту, проводили струшування протягом 7-10 хвилин та осаджували шляхом центрифугування протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Далі проводили порівняльне титрування надосадової рідини та вихідного вірусомісного матеріалу, порівнюючи їх інфекційні титри. Результати експерименту оцінювали за показниками редукції інфекційного титру (РІТ), який визначали за формулою:

$$РІТ = \lg TV_{в} - \lg TV_{н}$$

де $\lg TV_{в}$ – вихідний титр вірусів;

$\lg TV_{н}$ – титр вірусів в надосадовій рідині.

За різницею титрів визначали ступінь сорбційної здатності вірусів до бентоніту. Якщо різниця у титрі вірусів до та після виснаження бентонітом була більш як 1,5 lg, то такий маркер оцінювали як “плюсовий”, а досліджену популяцію відносили до варіанту $A_{\text{бент}^+}$. В тому випадку, коли титр знижувався менш як на 0,5 lg, досліджувані штами відносили до генетичного варіанту $A_{\text{бент}^-}$. Якщо падіння титру відбувалось в інтервалі від 0,5 до 1,5 lg – такий варіант оцінювали як варіант з проміжною характеристикою – варіант $A_{\text{бент}^{\pm}}$.

2.2.7.2 Визначення маркеру gct₄₀

Принцип методу полягає в тому, що вірулентні штами вірусу поліомієліту здатні до репродукції при вищих температурах у порівнянні з вакцинними (атенуйованими) штамами. Маркер gct₄₀ визначали методом паралельного титрування при 37°C та 40°C з використанням трьох ліній перещеплюваних клітинних культур: RD, HEp-2 і Vero [171]. Титрування проводили мікрометодом з використанням 96-лункових стерильних планшетів. Для точності визначення титру, на кожне зроблене десятикратне

розведення брали по чотири лунки. Зразки витримували в термостатах з додаванням 5% CO₂. Облік результатів здійснювали на 3-7 добу. Показник rct₄₀ оцінювався у вигляді різниці титрів вірусу при різних температурах (37°C та 40°C). Слід відмітити, що визначення rct₄₀ інших видів ентеровірусів здійснювалось за аналогією з вірусами поліомієліту, для яких був розроблений та апробований даний генетичний маркер. Вважали, що різниця в 5 і більше lg ТЦД₅₀ характерна для вакцинних або авірулентних, так званих «холодних» вірусних штамів (ознака rct₄₀⁻), різниця у 2 або менше lg ТЦД₅₀ характерна «гарячим» чи вірулентним штамам (ознака rct₄₀⁺). У випадку зменшення інфекційного титру в межах 2-5 lg ТЦД₅₀, такі штами відносили до проміжних (rct₄₀[±]).

2.2.7.3 Визначення розміру вірусних бляшок під бентонітовим покриттям (S-маркер)

Досліджуваним вірусним штамом інфікували моношари культур клітин HEp-2 і культивували протягом 48 годин під бентонітовим поживним середовищем (покриттям), після чого здійснювали вимірювання розмірів 50-100 бляшок, що сформувались, вираховуючи середнє арифметичне. Вірус вважали не вірулентним (атенуйованим), якщо розміри бляшок перевищували 2,5мм, вірулентним – при розмірах бляшок до 1,5 мм включно, проміжним при діаметрі від 1,5 до 2,5 мм

2.2.8 Проведення дослідження на дисбіоз та оцінка результатів

Для дослідження випорожнень на дисбіоз біоматеріал без консерванту доставлявся в лабораторію не пізніше 2 годин з моменту забору. Згідно з обраною методикою [246], матеріал, доставлений у пізніші терміни, зберігався не більше 4 годин при температурі 4-6°C. Кал відбирався у попередньо зважені флакончики в кількості 1,0 г, після повторного зважування встановлювалась вага проби і додавалась така кількість ізотонічного розчину, щоб отримати основне розведення (10⁻¹). Із основного розведення шляхом послідовних десятикратних розведень готувались розведення 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷ та 10⁻⁸

окремими стерильними піпетками. Подальше дослідження виконувалось наступним чином:

1. Для виявлення патогенних ентеробактерій нативний матеріал рідкої консистенції або розведення 10^{-1} матеріалу щільної консистенції петлею засівали на середовище Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфіт агар. Крім того, виконували посів 1-2 мл матеріалу на середовище збагачення – селенітовий бульйон, розлитий у пробірки по 5-7 мл.
2. Для визначення грибів з розведення 10^{-3} по 0,1 мл засівали на середовище Сабуро з левоміцетином, для виявлення стафілококів 0,1 мл з цього ж розведення засівали на жовтково-сольовий агар.
3. Із розведення 10^{-5} 0,1 мл засівали на середовище Ендо і 0,01 мл для виявлення і кількісного підрахування ентеробактерій, неферментуючих мікроорганізмів та 0,01 мл – на 5 % кров'яний агар для виявлення бактерій кокової групи і гемолітичної мікрофлори.
4. Із розведень 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} по 1 мл засівали 1 мл в “Середовище для контролю стерильності” (тіогліколеве) для виявлення біфідобактерій.
5. Для кількісного визначення лактобактерій 0,1 мл з розведення 10^{-5} засівали на середовище МРС.

Посіви інкубували при 37°C протягом 24-48 годин, на середовищі Сабуро – 48 годин при 37°C і ще 3 доби при кімнатній температурі. Виділення та ідентифікацію патогенних ентеробактерій проводили по загальноприйнятій схемі. Для виявлення дисбіозу проводили кількісний облік мікроорганізмів, що вирости на жовтково-сольовому агарі, середовищах Сабуро, Ендо і 5% кров'яному агарі з перерахунком на 1 г фекалій, враховуючи при цьому дозу засіяного матеріалу і ступінь його розведення. Крім того, на чашці з 5 % кров'яним агаром відмічали наявність гемолітичних колоній як кишкової, так і кокової мікрофлори з подальшою ідентифікацією.

Наявність біфідобактерій визначали за характером росту на тіогліколевому середовищі та за результатами мікроскопії мазків, забарвлених за Грамом. Кількість біфідобактерій у 1 г фекалій визначали по граничному

розведенню. При наявності росту стафілококів на ЖСА та кандид на середовищі Сабуро здійснювали їх ідентифікацію. Із середовища Ендо відсівались лактозонегативні і домінуючі лактозопозитивні колонії. Із 5% кров'яного агару знімали колонії, які мали властивість гемолізу, а також ті колонії, що дали ріст тільки на цьому середовищі. Посів на середовищі Плоскирева використовували для кількісного обліку протеїв, що характеризуються повзучим ростом.

Для диференціації *E. coli* з нормальною і *E. coli* зі зниженою ферментативною активністю приймалися до уваги характер росту на диференціально-діагностичних середовищах з лактозою (Ендо, Олькеницького).

Критеріями для діагностики стану дисбіозу служили: підвищення ($> 10^8$ КУО/г) або зменшення ($< 10^6$ КУО/г) кількості кишкової палички, виявлення біфідобактерій у кількості $< 10^8$ КУО/г фекалій, виявлення лактозонегативних або ешерихій із зниженою ферментативною активністю у кількості $> 10^6$ КУО/г фекалій, поява гемолітичних форм бактерій, які повинні бути відсутніми у здорових людей, виявлення умовно-патогенних грам-негативних паличок (протеїв, клебсієл, цитробактерів, псевдомонад, ацінетобактерів та ін.) в кількості $> 10^4$ КУО/г фекалій, виявлення дріжджоподібних грибів роду *Candida* більше, ніж 10^3 в 1 г, присутність *S. aureus* [246].

2.2.9 Виділення бактеріофагів

Виявлення F-специфічних РНК-бактеріофагів (фаги MS₂) та соматичних фагів кишкової палички з кількісним підрахунком проводили методом агарових шарів за Грація [247]. З метою індикації бактеріофагів використовувалися культури *E. coli* K12 Fr+ та *E. coli* B ДІСК 240368, що були отримані із лабораторії санітарної мікробіології ДУ Інститут громадського здоров'я ім. О.М. Марзеєва НАМН України.

2.2.10 Постановка імуноферментного аналізу

В роботі використано тест-систему RIDASCREEN Norwalk-like Virus виробництва фірми r-Biopharm (Німеччина) для імуноферментного аналізу,

яка передбачає виявлення антигену вірусу Норфолк в фекальних масах людини. 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.

2.2.11 Титрування та типування ентеровірусів

Титрування вірусів проводили двома способами: мікрометодом за ТЦД₅₀ та за бляшкоутворенням під бентонітовим покриттям. Методика титрування за ЦПД (мікрометод) принципово не відрізнялася від загальновідомої. В окремих випадках, здійснювали титрування вірусів за бляшкоутворенням під бентонітовим покриттям

Вказаний метод титрування вірусів мав наступні етапи:

1. Приготування моношарів клітин на дні пеніцилінових флакончиків або колбочок Ерленмейєра (середня посівна доза складала 2×10^4 клітин на один флакон та 2×10^7 клітин на колбочку Ерленмейєра). На кожне дослідне розведення використовували по 4 флакончики або колбочки Ерленмейєра.

2. Отримання десятикратних розведень вірусів в середовищі підтримки (199, DMEM, Ігла).

3. Внесення 0,1 мл вірусомісного матеріалу з кожного розведення на клітинний моношар з подальшою адсорбцією вірусів протягом 30 хв при температурі $+37^{\circ}\text{C}$. Далі інфіковані моношари заливали бентонітовим поживним покриттям наступного складу: бідистильована вода – 415 мл; 5% гель бентоніту - 5 мл; розчин Ерла (десятикратний концентрат) – 50 мл; сироватка великої рогатої худоби – 15 мл; 7,5% розчин бікарбонату натрію - 15 мл; пеніцилін 200 МО/мл; стрептоміцин - 100 мг/мл.

4. Облік результатів. Кількість бляшок рахували в кожному розведенні через 48 годин. Далі обирали таке розведення, при якому кількість бляшок

була в межах, зручних для підрахунку. Це розведення вважали основним. Кількість бляшок в усіх розведеннях зводили до ступеня основного розведення та визначали середнє арифметичне. Титр виражали як добуток середнього арифметичного кількості бляшок та ступеня основного розведення:

$$\text{Титр} = A \times 10^n,$$

де, A – середнє арифметичне; n – ступінь основного розведення. Для перерахунку титру вірусів в 1 мл, отриману величину множили на 10.

Методика реакції віруснейтралізації принципово не відрізнялась від загальноприйнятої [243, 248]. Всі експерименти проводились з використанням стандартних 96-лункових планшетів. На кожне десятикратне розведення вірусомісного матеріалу використано чотири лунки. Планшети поміщались в CO_2 - інкубатор на п'ять діб. Результати оцінювали за наявністю чи відсутністю ЦПД. В реакції використовувались наступні контролю: контроль титру вірусів, контроль клітинної культури та контроль діагностичної сироватки. Для кожного з контролів обирались також по чотири лунки.

Математичний аналіз результатів титрування вірусів проводили з використанням формули 2.1 [244]:

$$\log \text{ТЦД}_{50} = L - d (S - 0,5) \quad (2.1)$$

де ТЦД_{50} – титр вірусів в даному об'ємі

L – розведення вірусомісного матеріалу, виражене у вигляді негативного десятичного логарифму;

d – ступінь розведення вірусомісного матеріалу;

S – сума відношень кількості лунок з ЦПД до загальної кількості використаних мікрокультур, інфікованих наступним розведенням вірусомісного матеріалу.

Для вираховування квадратичного відхилення отриманих титрів вірусів використовували формулу 2.2.:

$$\sigma = \pm (\sqrt{\sum pq/n}) \cdot d \quad (2.2)$$

де, Σ - сума; p – відношення числа моношарів, що загинули до числа інфікованих даною дозою; $q = 1 - p$; d – логарифм кратності розведень;
 n - число моношарів, інфікованих даною дозою.

При постановці реакції віруснейтралізації з використанням індексу нейтралізації вираховували його квадратичне відхилення за формулою 2.3:

$$\sigma_{ni} = \pm \sqrt{\sigma_k^2 + \sigma_e^2} \quad (2.3)$$

де, σ_{ni} – квадратичне відхилення індексу нейтралізації;

σ_k – квадратичне відхилення ТЦД₅₀ у контролі;

σ_e – квадратичне відхилення ТЦД₅₀ у досліді.

В представленій роботі наведені лише кінцеві розрахунки, а саме – відхилення індексу нейтралізації.

Видову ідентифікацію ентеровірусних ізолятів проводили відповідно до останніх змін бази даних Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV, 2012) [72].

Таблиця 2.1

Класифікація ентеровірусів людини

Група А	Коксакі А 2-8, 10, 12, 14, 16; Ентеровірус 71, 76, 89-92, 114
Група В	Коксакі А9, Коксакі В1-6, ЕСНО 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33; Ентеровіруси: 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107
Група С	Коксакі А 1, 11, 13-17, 19-22, 24 ЕСНО 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116 Поліовірус 1-3
Група D	Ентеровіруси 68, 70, 94, 11

2.2.12 Концентрування вірусів для електронно-мікроскопічних досліджень

2.2.12.1 Концентрування вірусів поліетиленгліколем-6000 (ПЕГ-600) в присутності хлористого натрію

З розрахунку на кожні 100 мл вірусвмісного матеріалу, розчиняли 2,22 гр. хлористого натрію та додавали 7 грамів ПЕГ-6000, суспензію перемішували на магнітній мішалці протягом 12 годин при +4°C та центрифугували при 2000 об/хв та 4°C протягом 60 хв. Надосад зливали, а осад ресуспензували в фосфатно-сольовому буфері, гомогенізували та повторно центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв з метою видалення нерозчинного матеріалу. Описаний метод концентрування забезпечує 100% вихід вірусу та дозволяє сконцентрувати вірусвмісний матеріал в 50-100 разів [248].

2.2.12.2 Концентрування ентеровірусів бентонітом

У даному методі використано здатність ентеровірусів до сорбції на сорбенті бентоніті при кислих значеннях рН. При лужних рН та відсутності двовалентних катіонів ентеровіруси здатні десорбуватись в елюючий розчин. За таким принципом із великих об'ємів вірусвмісного матеріалу можна отримати значно менші об'єми (5-10 мл) з концентрацією ентеровірусів на два-три і більше порядки [249].

Основні етапи концентрування ентеровірусів за допомогою бентоніту:

1. Адсорбція: до вірусвмісного матеріалу додавали 5% гель бентоніту з розрахунку 500 мкл 5% сорбенту на 250 мл вірусвмісного матеріалу (надалі увесь розрахунок компонентів наводиться на 250 мл вірусвмісного матеріалу). Потім за допомогою 1N HCl доводили рН до показників у межах 4,5-5,0. Для підвищення ймовірності контакту ентеровірусів з часточками бентоніту суспензію інтенсивно струшували та центрифугували протягом 20 хв при 3000 об/хв. Надалі в роботі використовували отриманий осад.

2. Декатіонізація: до отриманого осаду додавали 10 мл дистильованої води, інтенсивно струшували та центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин, надалі використовували осад.

3. Елюція: до отриманого осаду додавали 1,0-1,5 мл 0,05 М трис-буферу (рН 9,0), струшували та центрифугували при 3000 об/хв протягом 15-20 хв, відбираючи перший елюат. З осаду, який залишився, проводили повторну елюцію та отримували другий елюат. Перший і другий елюати змішували. Отриманий концентрат містив 80-90% вірусів, які знаходились у вихідному вірусвмісному матеріалі. В деяких випадках проводили повторне концентрування.

2.2.12.3 Концентрування ентеровірусів ультрацентрифугованням

Використана в роботі методика концентрування ентеровірусів ультрацентрифугованням принципово не відрізнялась від раніше описаної [250]. Для цього використовували кутовий ротор РПУ-50Т. Час центрифугування, як правило, дорівнював 30 хв, проте, інколи, для формування компактного осаду його збільшували до 45 хв. Сконцентровані такою методикою віруси знаходились в об'ємі 2-4 мл.

2.2.12.4 Концентрування з використанням гідрогельметилкремнієвої кислоти (ГГМКК)

В основі методу лежить принцип фізичної адсорбції ентеровірусів на кремнійорганічній матриці сорбенту [251]. Досліджувані зразки нагрівали до температури 20°C та доводили рН 5,0 (з використанням 1 М розчину HCl). До 50 мкл освітленої та підкисленої проби додавали 0,1 г ентеросгелю ГГМКК), ретельно струшували вручну (4-5 хв). Пробу води із внесеним Ентеросгелем розливали у стерильні центрифужні склянки та центрифугували при 1000 об/хв впродовж 10-20 хв. Білий осад, який утворився, є дуже легким та не щільним, тому надосадову рідину обережно декантували, залишаючи на дні флакону не тільки осад, а ще й надосад (загальний об'єм близько 20 мл). Утворений залишок струшували та переносили в дві центрифужні пробірки, повторно центрифугували за вказаних вище умов. Після повторного

центрифугування надосадову рідину видаляли, а до щільно сформованого осаду, що являє собою осаджений комплекс «вірус-ГГМКК», додавали 2,0 мл 0,05 М трис-буферу з рН 8,4, легко струшували та залишали при кімнатній температурі на 4-5 хв. Потім центрифугували при 2000-3000 об/хв впродовж 20 хв. Відбирали у стерильні пробірки надосад (елюат), що є концентратом вірусів (загальний об'єм 4 мл), і використовували для подальшого дослідження. Процес концентрації вірусів з проб займав загалом не більше 1,5-2,0 годин.

2.2.12.5 Концентрування з використанням двофазного розділення

Концентрування проводили у наступному порядку [244]:

1. Підготовка реактивів

- 22% декстран (по масі) – 40 г декстрану Т 40, 142 мл стерильної дистильованої води. Для розчинення використовували магнітну мішалку;
- 29% ПЕГ 6000 (по масі) – 363 г ПЕГ 6000 та 888 мл стерильної дистильованої води. Для розчинення використовували магнітну мішалку;
- 150 мл 5 М NaCl;
- 1 N NaOH та 1 N HCl для встановлення заданого рН.

2. Концентрування проби (0,5 л)

- Вірусвмісну рідину центрифугували протягом 10 хв. при 1000 g. Надосадову рідину переносили в колбу ємністю 1 л;
- Доводили рН до нейтрального рівня (7,0-7,5) 1 N NaOH та вимірювали кінцевий об'єм;
- До 50 мкл вірусвмісної рідини додавали 3,9 мл 22% розчину декстрану, 28 мл 29% розчину ПЕГ 6000 та 3,5 мл 5 М розчину NaCl. Ретельно перемішували та витримували 1 годину при температурі 4°C та безперервному перемішуванні на магнітній мішалці;
- Приготовлену суміш переливали у стерильну конічну воронку, що була закріплена на штативі, та залишали на ніч при 4°C;

- Вранці обережно відкривали кран воронки, повільно випускаючи рідину, та збирали нижній її шар і проміжну фазу в стерильну пробірку.

2.2.13 Електронно - мікроскопічні методи дослідження

Уся робота виконувалась у лабораторії електронно-мікроскопічних досліджень кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України. 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 ураніацетату 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 [252]. Найчастіше використовували опорні сітки з характеристикою 200-300 mesh. Підготовка матеріалу з метою отримання ультратонких зрізів для електронної мікроскопії проводили класичним методом [353], але дещо його модифікували: для префіксації матеріал витримували в 20 мл 4% розчину глютаральдегіду 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. Зневоднення проводили у такій послідовності: занурювали зразки у 50% етиловий спирт (тричі по 5 хвилин), далі їх витримували у 70 % та у 95% етиловому спирті по 10 хв. В розчин 70% та 95% спирту додавали ураніацетат до 2% концентрації. Після цього зразки тричі по 5 хв витримували у 100 % етиловому спирті, а потім в пропіленоксиді (зміну абсолютного спирту і пропіленоксиду проводили тричі). Далі зразки по черзі 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.

По завершенню даного етапу зразки поміщали в пласкі ванночки з робочою сумішшю (Epon 812, Araldit 502, DDSA у співвідношенні 1:1:2, каталізатор DMP-30 6 крапель на 10 мл) та витримували в термостаті при 60-70°C не менш як 15 годин до повного затвердіння робочої суміші. Після такої обробки, матеріал, залитий в робочу суміш, готовий до різання на ультрамікромомі.

Для отримання зрізів кишківника в якості фіксатора використовували фіксатор Колфільда, в основі якого лежить фіксатор Палада з додаванням 4,5% розчину сахарози. Запасний буферний розчин в себе включав: 5,5-диетилбарбітурату натрію – 14,7 г; ацетату натрію – 9,7 г; води бідистильованої - 500 мл [254].

Запасний розчин чотирьохоксиду осмію – 2% розчин чотирьохоксиду осмію на бідистильованій воді. Фіксатор в себе включав: 5 мл запасного буферного розчину; 5 мл 0,1 М HCl; 2,5 мл бідистильованої води; 12,5 мл 2% розчин чотирьохоксиду.

Зрізи одержували з використанням скляних ножів на ультрамікромомі «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 за стандартною методикою [255, 256]. На усіх електронних мікрофотографіях, представлених у розділі 5, вказано збільшення електронного мікроскопу, при якому відбувалась фотозйомка об'єктів. На електронограмах, представлених у розділі 9, вказано проєкційне збільшення.

2.2.14 Генетичні методи дослідження

2.2.14.1 Виділення РНК

РНК ентеровірусів виділяли класичним способом із культурального вірусомісного матеріалу з використанням комерційного набору «РибоСорб»,

фірми «Амплиценс», Російська Федерація, відповідно до інструкції виробника.

2.2.14.2 Зворотна транскрипція

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 (M-MLV – зворотна транскриптаза) з набору “Реверта-R-100” (“Амплиценс”, Росія), 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°.

2.2.14.3 Полімеразна ланцюгова реакція

Реакцію ампліфікації проводили з використанням багатоканального ампліфікатору “Perkin Elmer” (США) за класичною методикою, адаптованою під наші об'єкти. В режимі ампліфікації відбувалось 40 автоматичних циклів, протягом яких кількість отриманих копій дослідної ділянки, збільшуючись з кожним циклом в геометричній прогресії, була достатньою для візуального обліку результатів реакції після електрофорезу в агарозному гелі. Перший цикл, так званий “гарячий старт”: мікропробірки поміщали в ампліфікатор з активним регулюванням після того, як температура піднімалась до 94°C. Кожен із 40 циклів складався з:

- денатурації T 94°C – 10 сек.;
- віджигу T 53°C – 5 сек.;
- елонгації T 72°C – 2 хв.

В останньому циклі елонгація тривала 4 хвилини при T 72°C [243].

2.2.14.4 Електрофоретичний аналіз

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), який містив 0,5 мкг/мл етідія броміду (2,7-діаміно-10-етіл-9-фенілфенантрідиній бромід). Методика постановки була класичною [243].

2.2.15 Моделювання дисбіозу на лабораторних тваринах

Експериментальною моделлю слугували 30-денні білі миші лінії Balb/c, що пройшли попередню акліматизацію в умовах віваріюї. Дисбіоз моделювали шляхом введення тваринам комбінації антибіотиків [229].

2.2.16 Приготування поживних середовищ та суспензій мікроорганізмів

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 згідно Інформаційного листа МОЗ України № 05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль поживних середовищ», (Київ, 2000).

З поверхні поживних агарових середовищ стерильним фізіологічним розчином змивали тест-культури мікроорганізмів та доводили до необхідної для проведення експериментів кількості одиниць оптичного стандарту щільності за McFarland. Число живих мікроорганізмів визначали методом серійних розведень з подальшим висіванням на відповідні поживні середовища.

2.2.17 Визначення антимікробних та сорбційних властивостей сорбентів

З добових культур у фізіологічному розчині готували суспензії по стандарту мутності, що містили 5×10^8 мікробних клітин в 1 мл, з яких далі робили розведення відповідно до завдань та методики досліджень.

Антимікробну активність досліджуваних препаратів вивчали методом серійних розведень або методом дифузії в агар [257]. В експериментах використовували різні поживні середовища, відповідно до потреб

мікроорганізмів: м'ясо-пептонний агар, м'ясо-пептонний бульйон – для стафілококів, кишкової палички, псевдомонад, протей, 5% глюкозний бульйон або 5% глюкозний агар для стрептококів і середовище Сабуро для кандид.

Використовуючи метод серійних розведень, готували розведення сорбентів в різних середовищах та засівали суспензією одного з дослідних штамів тест-культур, що містила 10^7 мікробних тіл в 1 мл або робили поверхневий посів «газоном» суспензіями мікроорганізмів з концентрацією 5×10^7 мікробних тіл в 1 мл. В засіяних середовищах робили лунки діаметром 6 мм і вносили в них в нативному стані сорбент. Після 24 годинної інкубації в термостаті при 37°C вимірювали в мм діаметри зон інгібіції росту тест – мікроорганізмів, що утворилися внаслідок дії препаратів.

Для визначення в динаміці антимікробної активності, а саме часу її прояву, сорбенти зважували по 100 мг і на ці зразки наносили суспензії еталонних штамів мікроорганізмів, що містили 2×10^6 мікробних клітин в мл. Суміші витримували при кімнатній температурі, через 1, 3, 6 та 24 години контакту, надосадову рідину в об'ємі 0,05 мл висівали на відповідні тверді поживні середовища. Через 24 години на такі ж середовища висівали і осад – сорбент. В якості контролю використовували вихідні мікробні зависі без сорбенту.

2.2.18 Методи статистичної обробки отриманих результатів

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 [258, 259, 260]. Для оцінки вірогідності різниці показників двох сукупностей, одержаних в процесі досліджень, визначали ступінь розходження їх середніх значень з використанням t-критерію Стьюдента [258, 259, 260]. Основні етапи математичного аналізу були наступними :

Визначення середніх величин M із отриманих показників досліджень M_1, M_2, \dots, M_N за формулою 2.4:

$$M' = \frac{M^1 + M^2 + \dots + M^N}{N}, \quad (2.4)$$

де N – кількість спостережень.

Визначення середньої квадратичної помилки вибіркового середнього (2.5),

$$m = R/V \quad (2.6)$$

де R – розмах, різниця між максимальною та мінімальною величинами: $M_{\max} - M_{\min}$;

V – коефіцієнт, значення якого визначається числом спостережень отримані величини виражали як $M \pm m$.

Оцінка вірогідності різниці шляхом визначення t -критерію Стьюдента за формулою 2.6:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \quad (2.6)$$

При невеликій кількості об'єктів спостережень для оцінки різниці між частотами появи в окремих серіях, середню квадратичну помилку ($n < 30$) розраховували за формулою 2.7:

$$Z = \sqrt{\frac{X_1(1-X_1)}{n_1} + \frac{Y_1(1-Y_1)}{n_2}} \quad (2.7)$$

де n – кількість спостережень, X та Y – частота виявлення (в %) окремих ознак в серіях спостережень (X_1, X_2, \dots, X_n).

Потім знаходили нормоване відхилення величини за формулою 2.8:

$$t = \frac{|X_1 - Y_1|}{Z}, \quad (2.8)$$

де z – відповідно обчислений раніше коефіцієнт. Далі за табличними даними розраховується вірогідність P , що відповідає знайденому значенню t .

Статистичний аналіз проводили за допомогою стандартного пакету прикладних програм для медико-біологічних досліджень «Statistica 6,0 for Windows», EXCEL.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОШИРЕНOSTІ ЕНТЕРОВІРУСІВ, ВІРУСІВ НОРФОЛК ТА КИШКОВИХ ФАГІВ У ОСІБ З ДИСБІОЗОМ

Фізіологічне значення більшості вірусів, які перебувають в організмі здорової людини, залишається не відомим. Новітні технологічні підходи, направлені на індикацію вірусів, дають підстави припустити, що наявність вірусів в організмі здорової людини потрібно розглядати значно ширше, ніж з позиції патогенності [11]. Нещодавні дослідження дозволили віднести до представників вірому пікорнавіруси, які заселяють в основному шлунково-кишковий тракт, не викликаючи клінічно вираженої патології [9, 10].

З'ясування ймовірного значення вірусів в структурі формування дисбіотичних розладів потребувало в першу чергу порівняльного аналізу частоти реєстрації цитопатогенних агентів у людей контрольної групи і осіб з порушеним мікробіоценозом, а також подальшої їх видової ідентифікації.

3.1 Визначення присутності цитопатогенних агентів у зразках, отриманих від різних категорій осіб

Матеріал (фекальні маси) отримували з різних регіонів України. Загалом було відібрано і досліджено 740 зразків. Найбільшу кількість зразків було отримано у м. Києві (n=362), Івано-Франківській (n=224) та Київській обл. (n=154). Окремо було відібрано 49 зразків фекалій від хворих на ВІЛ-інфекцію. Для дослідження обирались так звані "наївні" пацієнти, які мали СД₄ в межах менше 500 кл/мл.

Віковий розподіл пацієнтів, від яких отримано зразки, був наступним: від дітей першого-другого року життя отримано 266 зразків (36%), від дітей 3-5 років – 78 зразків (10,6 %), 6 - 7 років – 54 зразки (7,3%), 8 - 13 років – 66 зразків (8,4%), 14-15 років - 28 зразків (3,8 %), від осіб 16 -30 років – 62 зразки

(8,4 %), осіб 30-59 років – 132 зразки (17,9 %), 60 і старших – 54 зразки (7,3 %) (рис. 3.1.).

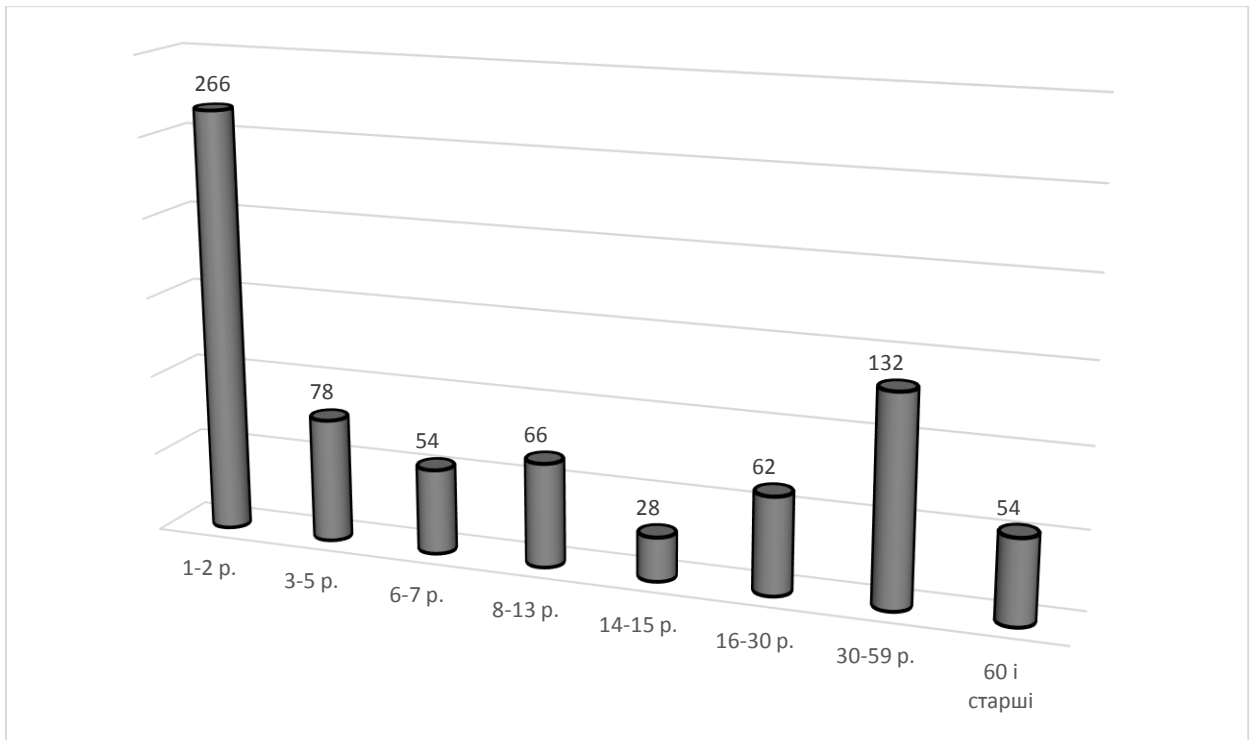


Рис. 3.1. Віковий розподіл отриманих зразків.

Всі зразки були систематизовані та розділені за двома принципами:

1. За результатами бактеріологічних досліджень на наявність дисбіотичних порушень.

2. За первинним діагнозом. Відповідно до цього підходу зразки були поділені на три групи: зразки, отримані від категорії осіб, які звертались в лікарняний заклад з порушеннями з боку шлунково-кишкового тракту; особи, які звертались в лікарняний заклад з патологією позакишкової локалізації та здорові особи.

Особливий контингент складала хворі на ВІЛ-інфекцію, які знаходились на стаціонарному лікуванні. Для дослідження обирались так звані "наївні" пацієнти, які мали СД₄ в межах менше 500 кл/мл. Пацієнти представляли різні вікові групи. Загалом від хворих на ВІЛ-інфекцію було отримано 49 зразків фекальних мас. З них – 22 зразки від осіб віком 17-30 років, 23 зразки від осіб віком 30-45 років, і 4 зразки від осіб віком старше 45 років.

Усі зразки були поділені на такі групи:

I група містила зразки, у яких бактеріологічно підтверджено порушення складу нормальної мікрофлори кишківника. Таких зразків налічувалось 386. Серед них дисбіоз 1 ступеня (так званий компенсований, який характеризується незначними змінами в аеробній частині мікробіоценозу, відсутність змін з боку біфідо- та лактофлори) зареєстрований у 190 випадках (49%); дисбіоз 2 ступеня (субкомпенсований, характеризується не значним зменшенням вмісту біфідобактерій та появою кількісних змін з боку кишкової палички та інших умовно-патогенних мікроорганізмів) встановлений у 112 випадках (29%); дисбіоз 3 ступеня (розповсюджений, для якого характерне значне зниження вмісту біфідо- та лактофлори і суттєве зменшення кількості кишкових паличок) зареєстрований у 60 випадках (16 %) та дисбіоз 4 ступеню (декомпенсований, супроводжується відсутністю біфідобактерій, значним зниженням лактофлори, зростанням кількості як облигатних, так і факультативних, не характерних для здорової людини, умовно-патогенних мікроорганізмів в асоціаціях) – у 24 випадках (6 %). Частота реєстрації дисбіозів кишківника за ступенем мікробіологічних порушень складу нормальної мікрофлори показана на рисунку 3.2.

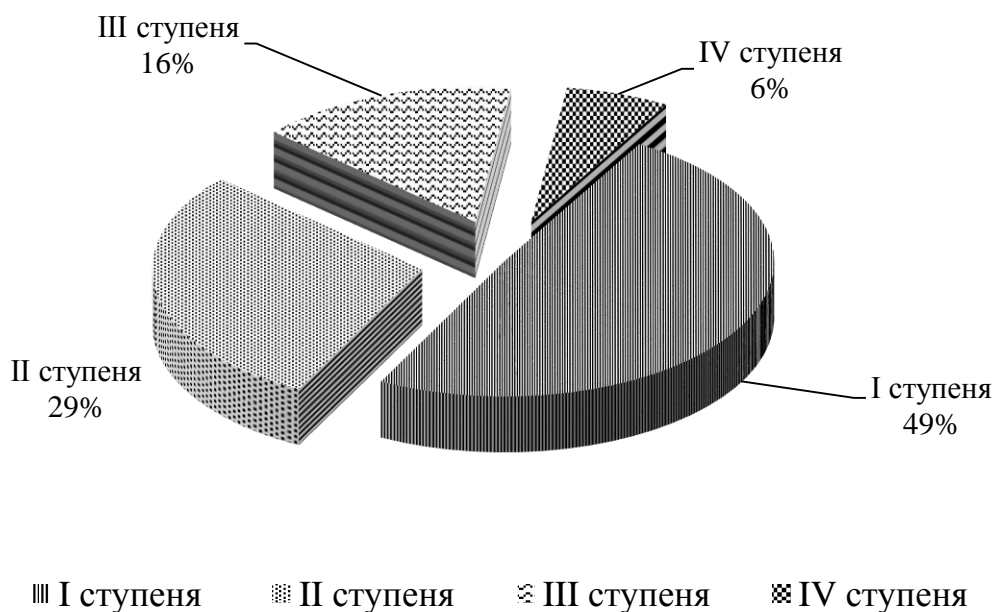


Рис. 3.2. Частота реєстрації дисбіозів кишківника за ступенем мікробіологічних порушень складу нормальної мікрофлори.

До другої групи віднесено зразки від осіб контрольної групи (n=354), у яких бактеріологічними методами не було встановлено порушень з боку мікробіоценозу кишківника (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Розподіл зразків за клінічним принципом

Категорія	Кількість зразків	%
Особи з розладами з боку шлунково-кишкового тракту	434	58,6
Особи з патологією позакишкової локалізації	174	23,5
Здорові особи (66 зразків)	132	17,8
Всього:	740	

З метою виявлення цитопатогенних агентів усі зразки були протестовані на культурах клітин: HEp-2 та RD. Досліджуваний матеріал (фекальні маси) обробляли за загальноприйнятими методами, регламентованими ВООЗ та МОЗ України для виділення ентеровірусів, (освітлювали, обробляли ефіром, антибіотиками та інфікували культури клітин) [12]. Наявність в зразках вірусних агентів оцінювали за наявністю або відсутністю цитопатогенної дії (ЦПД) в першому та другому пасажах.

Результати досліджень дали змогу зафіксувати зростання частоти реєстрації цитопатогенних агентів в осіб, які мали бактеріологічно підтверджені дисбіотичні розлади, в порівнянні з особами, в матеріалі від яких не було зафіксовано порушень з боку нормальної мікрофлори кишківника. Так, в матеріалі, взятому від осіб з дисбіозами, цитопатогенні агенти реєстрували у 56 випадках з 386 досліджених зразків, що складає 14,5% (табл. 3.2) [261]. 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 узятих зразків цитопатогенні агенти виявили в 31 випадку, що становило 8,76% ($p < 0,05$) (табл. 3.4).

За віковим показником частота виявлення цитопатогенних агентів у матеріалі, отриманому від осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори, була також різною: у осіб з дисбіозом кишківника цитопатогенні агенти найчастіше реєструвалися у зразках, узятих 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 з 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 ($p < 0,01$) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Частота реєстрації цитопатогенних агентів в осіб з дисбіозом
кишківника**

Вік	К-ть зразків	Культура клітин						Всього
		HEp-2			RD			
		1 пасаж	2 пасаж	разом	1 пасаж	2 пасаж	Разом	
1-2 р.	216	23	2	25	10	3	13	38
3-5 р.	48	4	0	4	1	0	1	5
6-7 р.	32	3	1	4	1	0	1	5
8-13 р.	26	2	0	2	0	0	-	2
14-15 р.	18	2	0	2	1	0	1	3
16-30 р.	14	1	0	1	0	0	0	1
30-59 р.	20	0	0	-	1	0	1	1
60 та старші	12	0	0	-	1	0	1	1
РАЗОМ	386							56

Не виключно, що зростання частоти реєстрації цитопатогенних агентів у категорій осіб 1-2, 6-7 та 14-15 років може бути пов'язано з виділенням ентеровірусів у цей період після активної імунізації, що проводиться відповідно до затвердженого в Україні Національного календаря профілактичних щеплень і включає використання живої поліовірусної вакцини [262].

Слід зазначити, що за результатами наших досліджень, частота реєстрації цитопатогенних агентів у зразках, отриманих від осіб з дисбіотичними порушеннями, залежала від ступеню дисбіотичних проявів: у зразках, отриманих від усіх досліджуваних категорій людей, вона коливалась від 8,33% до 18,9% (табл. 3.3). Найбільшу кількість цитопатогенів виявлено у зразках фекальних мас, які отримані від різних вікових категорій осіб з 1 ступенем дисбіозу, в даному випадку цитопатогени виявлялись у 18,9 % досліджуваних зразків. Разом з тим, найменше ЦПА зареєстрували при

значних порушеннях нормальної мікрофлори кишківника: при 3 та 4 ступенях дисбіотичних розладів такі агенти були визначені у 8 % випадків.

Таблиця 3.3

Частота реєстрації цитопатогенів в осіб дисбіозом кишківника в залежності від ступеню розвитку дисбіотичних порушень

Ступінь дисбіотичних порушень	Кількість зразків всього (n=386)	Кількість виявлених ЦПА	% виявлених ЦПА
I	190	36	18,9 %
II	112	13	11,6 %
III	60	5	8,33 %
IV	24	2	8,33 %

В осіб, в матеріалі від яких за результатами бактеріологічних досліджень не було виявлено порушень якісного та кількісного складу нормальної мікрофлори, з 354 узятих зразків цитопатогенні агенти виявляли в 31 випадку, що склало 8,76% (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Частота реєстрації ЦПА в осіб, які не мали порушень з боку нормальної мікрофлори кишківника за бактеріологічними показниками

Вік	К-ть зразків	Культура клітин						всього
		HEp-2			RD			
		1 пас	2 пас	разом	1 пас	2 пас	разом	
1-2 р.	86	4	0	4	3	1	4	8
3-5 р.	46	3	0	3	0	0	0	3
6-7 р.	48	2	1	3	3	0	3	6
8-13 р.	30	2	1	3	0	0	0	3
14-15 р.	32	2	0	2	0	1	1	3
16-30 р.	62	3	2	5	0	0	0	5
30-60 р.	38	1	0	1	1	0	1	2
≥ 60р.	12	1	0	1	0	0	0	1
РАЗОМ	354							31

Найбільше їх було виявлено в зразках, які отримані від дітей 6-7 років (з 48 зразків цитопатогенні агенти виявлені у 6 випадках, що складає 12,5 %), а також від дітей 8-13 років (3 випадки із 30 зразків, 10 %) та підлітків 14-15 років (3 випадки з 32 зразків, 9,38 %). Високі показники реєстрації цитопатогенних агентів виявили також і в групі дітей найменшої вікової категорії – 1-2 роки (з 86 досліджених зразків цитопатогенні агенти встановлено у 8 випадках, 9,3%), рідше – у дітей 3-5 років (3 зразки з 46 досліджених, 6,5 %). У дорослій віковій категорії 30-59 років та людей старше 60 років цей показник складав 5,25 та 8,4 % відповідно.

Отже, проведені експериментальні дослідження дали змогу встановити, що в осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника в цілому зростає частота виявлення в фекальних масах цитопатогенних агентів у порівнянні з особами, в матеріалі від яких не було зафіксовано дисбіотичних розладів. Разом з тим, встановлено, що чим більша глибина дисбіотичних порушень, тим рідше реєструється присутність цитопатогенних агентів.

Отримані результати проаналізовано також з позиції первинного діагнозу, з яким звертались пацієнти до лікувального закладу. Так, досліджено 740 зразків фекалій, що були отримані від пацієнтів, які мали розлади з боку шлунково-кишкового тракту, що супроводжувались діарейним синдромом (n=434); від пацієнтів з патологією позакишкової локалізації (n=174) та від здорових осіб (n=132). Розділення зразків за таким принципом має важливе значення, оскільки основний акцент нашої роботи зорієнтований на подальше виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу, а сьогодні на фоні проведеної масової вакцинації проти поліомієліту на перший план виходять ентеровірусні інфекції не поліомієлітної природи, яким притаманний поліорганный тропізм. До того ж щороку зростає кількість повідомлень про роль ентеровірусів у патології захворювань, які раніше відносили до соматичних [263, 264]. Крім того, 49 зразків фекалій одержано від хворих на ВІЛ-інфекцію.

Проведені експерименти дозволили констатувати присутність цитопатогенних агентів у зразках, одержаних від усіх досліджуваних категорій осіб. Водночас найбільший відсоток їх реєстрації відмічався у зразках, взятих від осіб із порушеннями з боку шлунково-кишкового тракту: з 434 досліджених таких зразків присутність ЦПА зафіксовано у 61 випадку (14,05%), більшість з яких виявлено у лініях культур клітин HEp-2. В зразках, узятих від осіб з патологією позакишкової локалізації, реєстрували ЦПА у 9,75 %, (17 випадків з 174 досліджених зразків) ($p < 0,05$). У здорових людей також часто виявляли присутність цитопатогенів (11 зразків з 132 досліджених), що склало 8,33 % (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5

Частота реєстрації ЦПА в залежності від наявності розладів з боку шлунково-кишкового тракту

Група	К- ть зраз- ків	Культура клітин							
		HEp-2			RD			Всього	
		1 пас	2 пас	разо- м	1 пас	2 пас	разо- м	N	%
Особи з розладами ШКТ	434	26	8	34	22	5	27	61	14
Особи з патологією позакишкової локалізації	174	9	1	9	7	1	8	17	9,8
Здорові	132	6	1	8	2	2	3	11	8,3

Найчастіше ЦПА реєстрували в матеріалі, взятому від дітей 1-2 року життя (у 4 випадках з 22 зразків). Не зафіксовано цитопатогенів у зразках, узятих від категорії «здорові особи» вікових категорій «3-5 р.», «8-13 р.», «60 і старше» (табл. 3.6).

З 49 зразків, отриманих від хворих на ВІЛ-інфекцію і протестованих на культурах клітин HEp-2 та RD, лише у чотирьох випадках було встановлено присутність цитопатогенних агентів, що становить 8,16%, при чому лише один з них (зразок №16), був здатен викликати цитопатогенний ефект у всіх досліджуваних клітинних культурах. У двох інших випадках ЦПД обмежувалась окремими лініями клітин (табл. 3.7). Таким чином, результати досліджень засвідчили відсутність зростання частоти виділення цитопатогенних агентів від хворих на ВІЛ-інфекцію, в порівнянні зі здоровими особами (8,16% та 8,3% відповідно) ($p < 0,01$).

Таблиця 3.6

Частота реєстрації ЦПА в здорових осіб в залежності від віку

Вік	К-ть зразків	Культура клітин						всього
		HEp-2			RD			
		1 пасаж	2 пасаж	разом	1 пасаж	2 пасаж	разом	
1-2 р.	22	2	0	2	1	1	2	4
3-5 р.	18	0	0	0	0	0	0	0
6-7 р.	14	2	0	2	1	0	1	3
8-13 р.	14	0	0	0	0	0	0	0
14-15 р.	12	0	1	1	0	0	0	1
16-30 р.	20	1	0	1	0	0	0	1
30-59 р.	28	1	0	1	1	0	1	2
60 та старші	4	0	0	0	0	0	0	0
РАЗОМ	132							11

Таблиця 3.7

**Частота реєстрації цитопатогенних агентів (ЦПА) у хворих
на ВІЛ-інфекцію**

Вік пацієнтів	Всього зразків	ЦПА	%
17-30 років	22	2	9,09
30-45 років	23	1	4,35
Старші 45 років	4	1	25
Всього	49	4	8,16

Так зване «носійство» деяких вірусів, зокрема ентеровірусів, вже тривалий час є дискусійним питанням вірусології. Сьогодні все більше вчених схиляються до думки про можливість існування так званого «здорового вірусоносійства», позиціонуючи його як важливу епідеміологічну особливість ентеровірусів [225, 226].

3.2 Видова ідентифікація цитопатогенних агентів з клінічного матеріалу від різних категорій осіб

Видову приналежність до ентеровірусів виявлених цитопатогенних агентів визначали у реакції віруснейтралізації з ентеровірусними діагностичними сироватками мікрометодом за загальноприйнятою методикою з використанням стерильних 96-лункових планшетів. Матеріалом слугували зразки, в яких попередніми дослідженнями було виявлено присутність цитопатогенів. Спочатку методом ЗТ-ПЛР було досліджено 87 зразків фекалій, які проявляли цитопатогенну дію у культурі клітин. Сучасні молекулярно-генетичні методи, що інтенсивно впроваджують в медичну практику, в майбутньому можуть поставити вірусологічну діагностику на якісно новий щабель. Найпоширенішим серед методів молекулярної біології із детекцією генетичного матеріалу є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [265]. Використані нами методологічні особливості генетичних досліджень:

виділення РНК, зворотна транскрипція, ампліфікація, дослідження продуктів ПЛР за допомогою електрофорезу в агарозному гелі – описані в розділі «Матеріали та методи».

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%) ($p<0,05$).

Отже, не можна виключати, що в таких зразках присутні інші агенти, не ентеровірусної природи. Натомість, при дослідженні проб стічної води нами було встановлено, що кількість позитивних зразків на наявність ентеровірусної РНК значно вища, чим позитивних проб відносно цитопатогенних ентеровірусів. Цю різницю можна пояснити присутністю нецитолітичних ентеровірусів, які не проявляють ЦПД на культурі клітин, а також тим, що інактивація вірусів у стічних водах відбувається в основному внаслідок вивільнення нуклеїнової кислоти з подальшою деградацією геному. Якщо інактивація вірусів відбувається через зміни в капсиді, то дані ЗТ-ПЛР та культурального аналізу можуть не мати повної кореляції [266], що спостерігалось у даному випадку [267].

Загалом, в категорії осіб з дисбіозами було отримано 386 зразків, відібрано 56 таких, які проявляли ЦПД хоча б на одній з використаних культур клітин, з них шляхом використання полівалентних діагностичних сироваток виду приналежність до ентеровірусів вдалось встановити в 34 випадках. Як показано на рис. 3.3, з них ізолятів поліовірусів – 24 штами (група С), вірусів Коксакі В – 7 штамів (група В), вірусів ЕСНО – 3 штами. П'ять штамів з даної категорії виявились не типованими, оскільки вони не нейтралізувались жодною з використаних специфічних імунних сироваток.

Від осіб, в яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичних порушень кишківника, отримано 354 зразків та відібрано 31 зразок, які давали ЦПД хоча

б у одній культурі клітин. Всі ідентифіковані в цій групі ентеровіруси були віднесені до 3 груп. Найбільш численну групу склали нетиповані ентеровіруси (6 штамів), на другому місці вакцинні ізоляти поліовірусів (група С) (4 штамів), на третьому – віруси Коксакі В (група В) (2 штамів) (рис. 3.4).

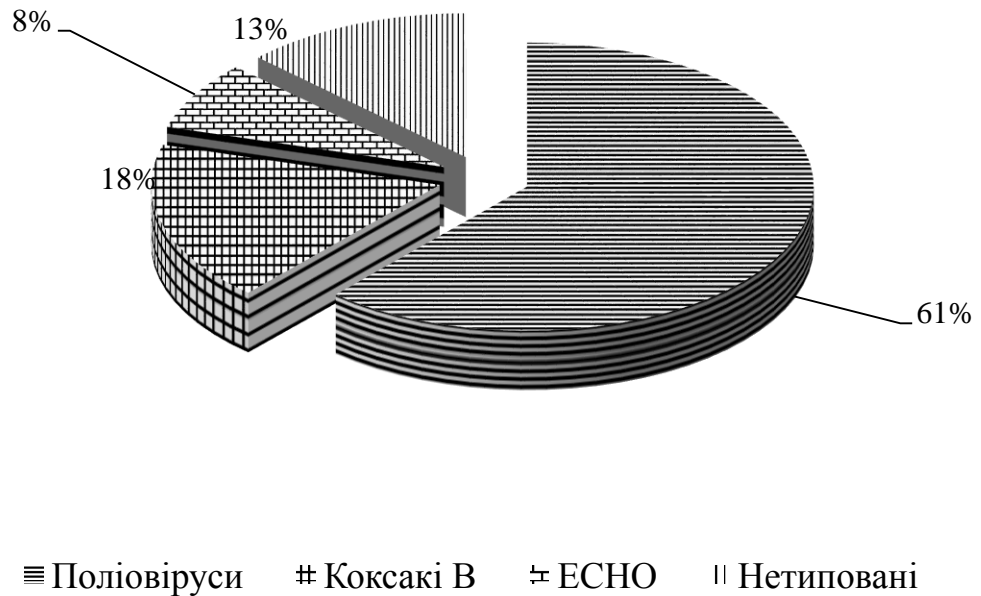


Рис. 3.3. Питома вага різних серогруп ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом.

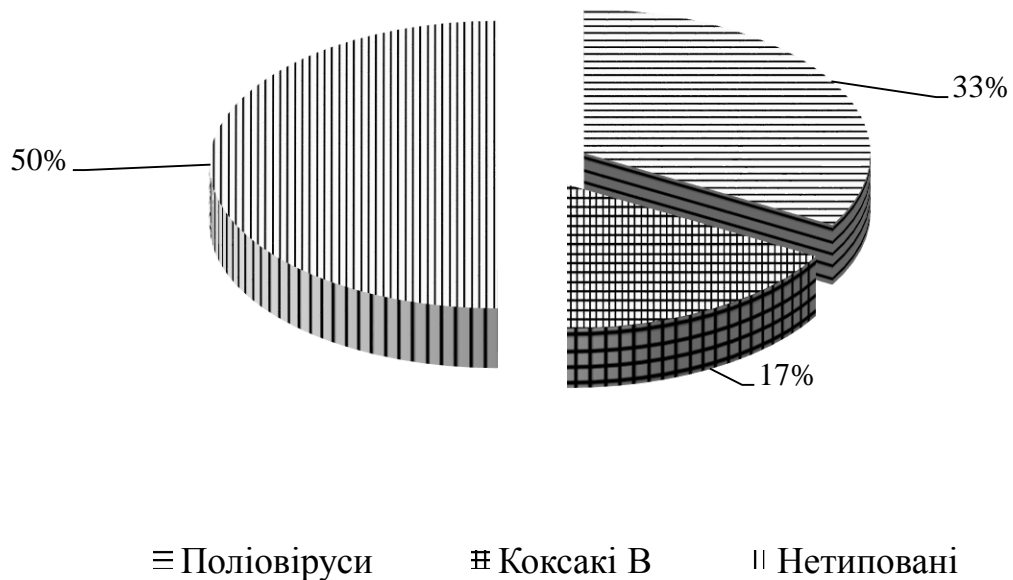


Рис. 3.4. Питома вага різних серогруп ентеровірусів, виділених від осіб з відсутнім дисбіозом

В категорії осіб з розладами позакишкової локалізації привертає увагу великий відсоток нерозшифрованих цитопатогенних агентів, що можна пояснити як наявністю одночасно двох та більше серотипів ентеровірусів в одному зразку, так і появою нових антигенних варіантів ентеровірусів, або рекомбінантних вірусів, які не нейтралізувалися стандартним набором використовуваних нами діагностичних імунних сироваток.

Після проведення типування виділених вірусів поліомієліту у реакції вірусної нейтралізації з поліклональними сироватками з'ясували, що з 24 зразків, які містили поліовіруси, 22 містили поліовіруси лише одного з трьох типів, а 2 зразки – суміші поліовірусів різних типів. Зокрема, один зразок містив віруси поліомієліту 1 та 2 типу, і один зразок містив поліовіруси 1 та 3 типу. Уся експериментальна робота проводилась до введення в дію Наказу МОЗ України № 237 від 24.03.2016 року «Про деякі питання застосування вакцини для профілактики поліомієліту», який передбачає заборону використання вказаних серотипів в наукових дослідженнях. Для відокремлення вірусів суміш інкубували протягом 2 годин при 36°C із кожною із типоспецифічних сироваток, що відповідали типам вірусів у суміші. Так, наприклад, для нейтралізації поліовірусу 2 типу застосовували антитіла, які є специфічними до 2 типу. Далі, вірусом, який залишився (не нейтралізувався) інфікували клітини НEr-2, інкубували до появи повної ЦПД та вивільняли вірусні часточки шляхом повторного заморожування та розморожування. Після цього отриманий зразок піддавали повторному типуванню в реакції вірусної нейтралізації з іншими типами імунних сироваток.

Як показано на рис. 3.5, у осіб з дисбіозом найчастіше реєструються віруси поліомієліту 1 серотипу (14 штамів), поліовірусів 3 серотипу виділено 8 штамів, поліовірусів 2 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», усі зразки клінічних

ізолятів вірусів поліомієліту 2 типу були знищені шляхом автоклавування у лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця (акт №1, від 04.05.2016 р.). Із 7 виділених вірусів Коксакі В (рис. 3.6) більше за все було виділено вірусів Коксакі В6 (4 штами), на другому місці Коксакі В2 (2 штами), на третьому Коксакі В3 (1 штама). Серед виділених вірусів ЕСНО усі три штами були віднесені до 3 серотипу.

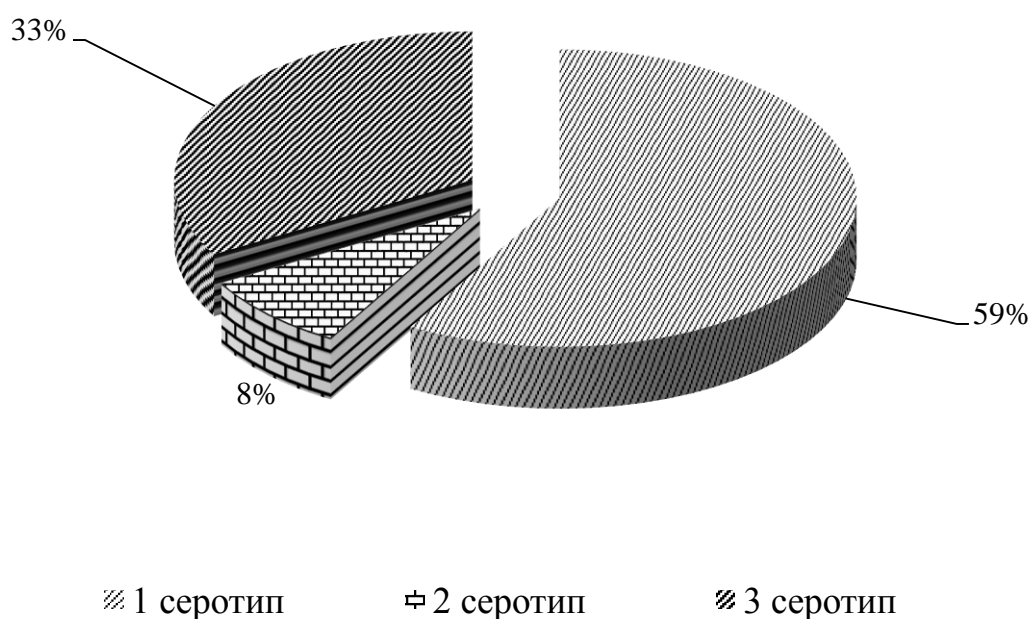


Рис. 3.5. Питома вага різних серотипів поліовірусів виділених від осіб з дисбіозом.

Типоспецифічна ідентифікація ентеровірусів, виділених від осіб, в яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичних порушень, дала такі результати: серед 4 штамів поліовірусів – три належали до вірусів 1 серогрупи і один до третьої. Серед двох штамів виділених вірусів Коксакі В– один нейтралізувався типоспецифічною сироваткою з антитілами проти серотипу В5, інший – В1, отже, відповідно до діючої класифікації (ICTV, 2012), обидва належали до групи В.

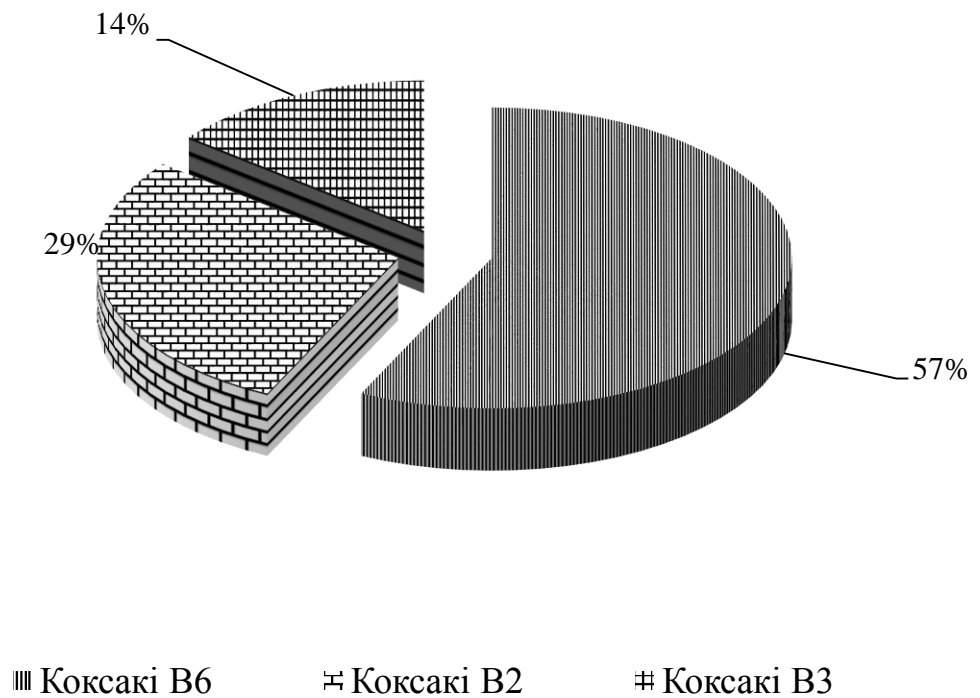


Рис. 3.6. Питома вага різних серотипів вірусів Коксакі В виділених від осіб з дисбіозом.

Одержані результати порівнювали із звітними даними Центральної СЕС МОЗ України, що стосувалися виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу в Україні у 2011-2013 рр. (рис. 3.7). На наявність ентеровірусів вірусологічними лабораторіями України було обстежено 7527 осіб з гострими кишковими інфекціями та нейроінфекціями (в тому числі з серозними менінгітами). Всього вдалося виділити 56 штамів ентеровірусів. Серед усіх штамів ентеровірусів, виділених від хворих, в Україні найбільшу частку склали віруси групи Коксакі В (30%), на другому місці були віруси ЕСНО (27%), поліовіруси (вакцинні штами) (14%) та ЦПА, які не вдалося типувати за допомогою діагностичних ентеровірусних сироваток (29%).

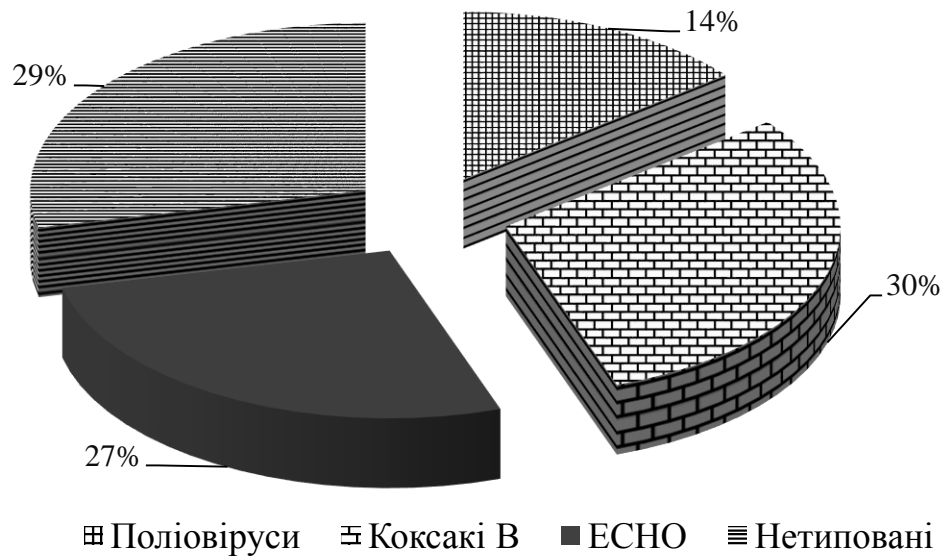


Рис. 3.7. Питома вага різних видів ентеровірусів, виділених із клінічного матеріалу на території України.

Після ерадикації поліомієліту у більшості країн світу на перший план стали виходити неполіомієлітні ентеровірусні захворювання [268]. На думку експертів ВООЗ, частота виділення неполіомієлітних ентеровірусів із клінічного матеріалу повинна складати близько 10%, в залежності від клімато-географічних та соціально-економічних умов [269]. Середня ж частота виділення вірусів цієї групи від людей в Україні становила 0,74%. Ця величина є загалом досить низькою і, очевидно, може свідчити про недостатню ефективність роботи вірусологічних лабораторій та потребу впровадження в роботу практичних лабораторій сучасних молекулярно-генетичних методів дослідження, що дає можливість проводити об'єктивнішу оцінку епідеміології даних вірусів та їх ролі в тій чи іншій патології.

Видовий склад ентеровірусів, виділених від хворих з підозрою на ентеровірусну інфекцію, близький до видового складу цих вірусів, виділених з зовнішнього середовища, зокрема зі стічних вод. Тут слід відмітити, що нещодавні наші дослідження стічних вод м. Києва свідчать про високі

показники присутності в них ентеровірусного геному: в цілому, з 60 досліджених зразків води у 29 випадках виявлено ентеровірусну РНК [270]. Найбільша питома вага ентеровірусів в стічних водах та клінічному матеріалі припадає на віруси групи Коксакі В (35% із стічних вод м. Києва, 44% стічних вод України та 30% із клінічного матеріалу). Меншу частину займали ентеровіруси групи ЕСНО (30% із стічних вод м. Києва, 33% стічних вод України та 27% із клінічного матеріалу), поліовіруси (9% із стічних вод м. Києва, 22% стічних вод України та 14% із клінічного матеріалу). Велику частку склали нетиповані ЦПА (26% із стічних вод м. Києва, 2% стічних вод України та 29% із клінічного матеріалу; рис. 3.8 та 3.9).

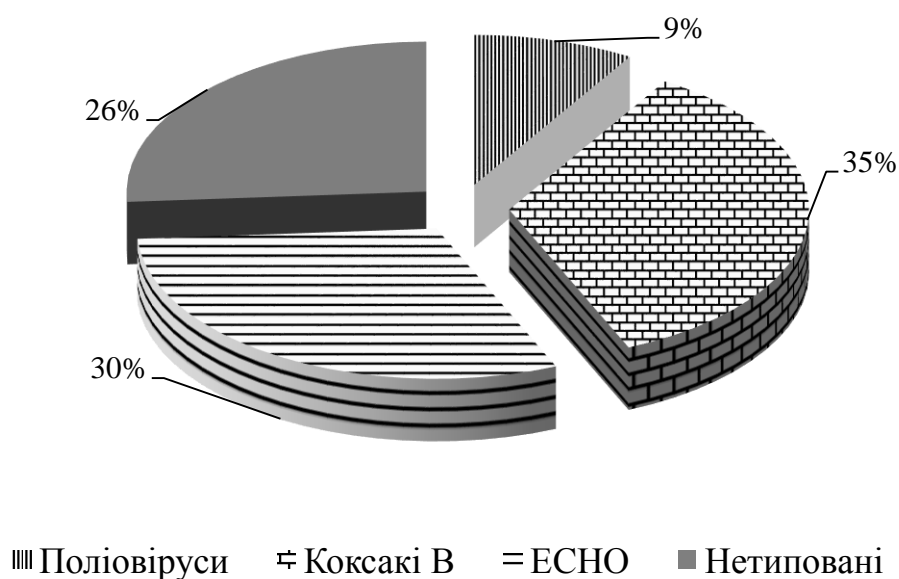


Рис. 3.8. Питома вага різних серогруп ентеровірусів, виділених із стічних вод м. Києва [296].

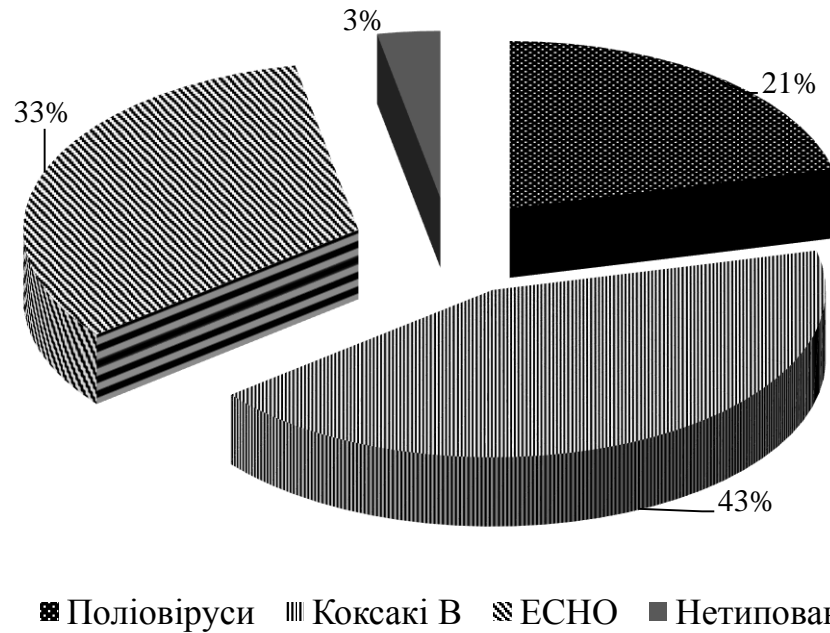


Рис. 3.9. Питома вага різних серогруп ентеровірусів, виділених із проб стічної води на території України [296].

За нашими даними, видовий спектр виділених ентеровірусів в осіб з дисбіотичними порушеннями суттєво відрізняється від вище наведених результатів: і в осіб з дисбіотичними порушеннями, і, в меншій мірі, в осіб з відсутністю дисбіозів, на перше місце за частотою реєстрації виходять ізоляти поліовірусів, частка яких в даних категоріях складала 59 і 54 % відповідно. Що стосується нетипованих штамів ентеровірусів, які пройшли молекулярно-генетичну (ЗТ-ПЛР) верифікацію, то вони були досліджені електронно-мікроскопічно і детально описані в розділі 6.

В результаті аналізу анамнестичних даних пацієнтів, від яких виділено ентеровіруси, було встановлено: по перше, серед 41 штаму виділених ентеровірусів – 29 виділено від осіб, які мають розлади з боку шлунково-кишкового тракту, 10 штамів виділено від осіб з патологією позакишкової локалізації та 2 штами виділено від здорових осіб (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

**Частота виділення ентеровірусів в залежності від наявності
розладів з боку шлунково-кишкового тракту**

Категорія	Кількість зразків	Кількість виділених штамів ентеровірусів	%
Особи з порушенням боку ШКТ	434	29	6,68
Особи в яких відсутні розлади з боку ШКТ	174	10	5,74
Здорові	132	2	1,52

По друге, за віковою категорією найбільше ентеровірусів виділено від дітей 1-2 року життя (17 штамів), на другому місті за кількістю виділених ентеровірусів діти 6-7 років (7 штамів), третю сходинку ділять група 3-5 років та вікова категорія 14-15 р. (по 4 штами), найменше – два штами у вікових категоріях 30-59 р., а в категорії осіб 60 і старше не виділено жодного штаму (рис. 3.10).

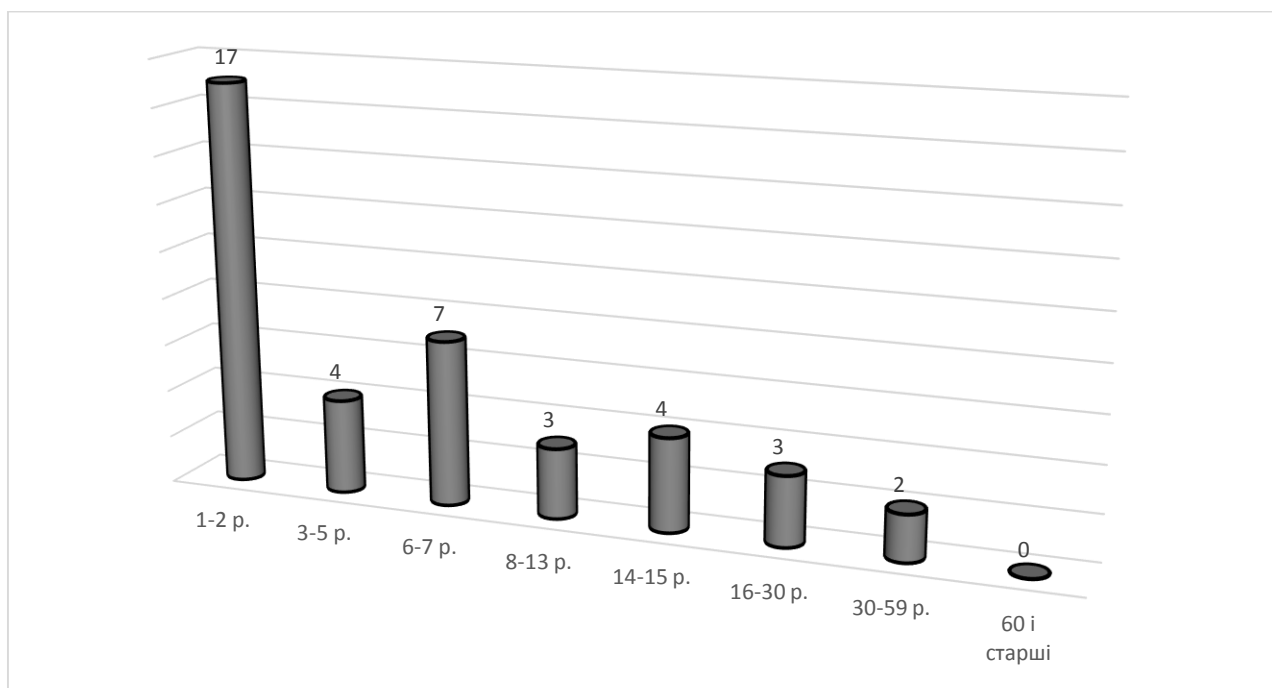


Рис. 3.10. Розподіл виділених ентеровірусів по групах за віком.

Результати засвідчили, що серед вірусів, які пройшли видову ідентифікацію, поліовіруси зустрічались найчастіше у віковій категорії 1-2, 6-7 р. та 14-15 р. (по 15, 6 та 3 штами, відповідно). Віруси Коксакі виділяли приблизно з однаковою частотою у всіх вікових групах, хоча найчастіше реєстрували у дітей вікових категорій 1-2 та 3-5 років. Віруси ЕСНО частіше виділяли від дорослих осіб у вікових групах 16-30 та 30-59 рр. Нетиповані ентеровіруси теж визначали практично у всіх досліджених вікових групах, водночас частота їх була найвищою у зразках, отриманих від дітей 6-7 р. Всього відсоток нетипованих ентеровірусів за нашими результатами склав 27,5% (табл. 3.9).

Водночас для досліджень було відібрано 49 зразків фекальних мас, отриманих від хворих на ВІЛ-інфекцію, які протестовано на присутність ентеровірусної РНК в ЗТ-ПЛР. В результаті проведених експериментів було встановлено присутність ентеровірусної РНК в зразку № 16, виділеного у культурі клітин НEr-2 (рис. 3.11). Після постановки реакції вірусної нейтралізації з полівалентними імунними сироватками (Коксакі, ЕСНО та

полівалентною поліовірусною сироваткою) встановлено, що даний ЦПА належав до вакцинних штамів поліовірусів 1 серотипу.

Таблиця 3.9

Залежність частоти виділення ентеровірусів від віку

Вік	Поліовірус и	Коксакі А	Коксакі В	ЕCHO	Нетиповані	Всього
1-2 р.	15	0	2	0	2	19
3-5 р.	2	0	2		0	4
6-7 р.	6	0	1	0	3	10
8-13 р.	1	0	1	1	2	5
14-15 р.	3	0	1		1	5
16-30 р.	1	0	1	1	1	4
30-59 р.	0	0	1	1	1	3
60 та старші	0	0	0	0	1	1

Таким чином, в результаті проведених молекулярно-генетичних досліджень показано, що частота виявлення ентеровірусної РНК в осіб з ВІЛ – інфекцією не перевищувала частоту виявлення ентеровірусної РНК у здорових осіб [271, 272, 273]. Вірусологічні дослідження також підтвердили відсутність зростання частоти виділення ентеровірусів у таких хворих. Ці дані певним чином корелюють з результатами досліджень, які проведені за кордоном [274, 275].

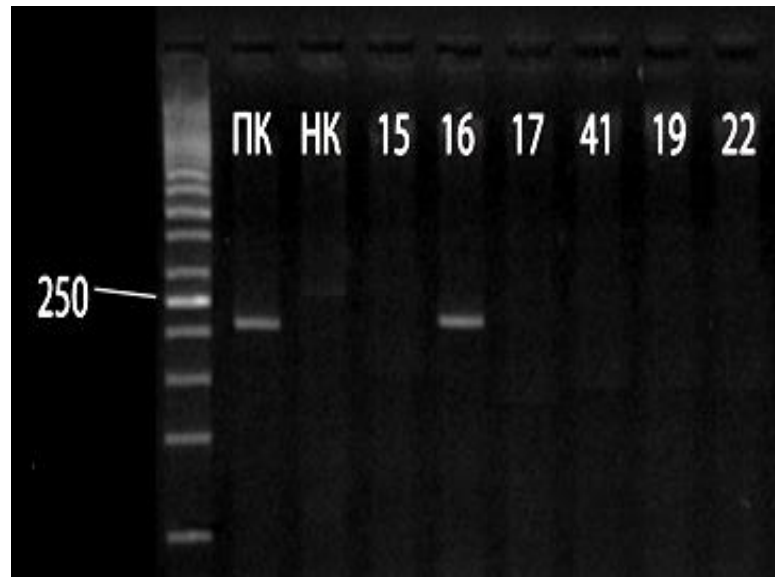


Рис. 3.11. Фрагмент електрофоретичного дослідження продуктів полімеразної ланцюгової реакції в агарозному гелі.

Результати експериментів можуть свідчити про те, що імунізація оральною поліомієлітною вакциною хворих на ВІЛ-інфекцію не створює умов для поширення циркулюючих вакцинних поліовірусів. Разом з тим, існують наукові повідомлення про зростання тривалості виділення вакцинних поліовірусів людьми з імунодефіцитами, що на думку вчених, може сприяти реверсії їх нейровірулентності [276]. В цілому, дане питання потребує детальних подальших досліджень.

3.3 Поширеність коліфагів у матеріалі від осіб з дисбіотичними порушеннями

Взаємодія мікробіому і вірому – сьогодні це одна з важливих проблем екологічної мікробіології

В цілому питання поширення кишкових вірусів у осіб з дисбіотичними розладами сьогодні залишається маловивченим. Певні аспекти взаємодії мікробіому та вірому, на наш погляд, можна з'ясувати шляхом дослідження поширеності кишкових фагів у людей без кишкової патології, з патологією

ШКТ, а також в осіб з дисбіотичними порушеннями. В наш час бактеріофаги в основному вивчають з позиції санітарної вірусології, оскільки існують наукові повідомлення, що вказують на пряму закономірність між кількістю бактеріофагів соматичних або F-специфічних та ентеровірусів у деяких об'єктах навколишнього середовища. Інколи дані мікроорганізми розглядають як можливу модель при мікробіологічній оцінці чистоти об'єктів навколишнього середовища [277, 278]. Як окремий напрямок залишається використання бактеріофагів при лікуванні гострих кишкових інфекцій (черевнотифозний, протейний, клебсієльозний бактеріофаги).

Крім того, деякі дослідники вказують на порівняно вищу частоту реєстрації інших кишкових вірусів, зокрема вірусів Норфолк, в осіб з дисбіозами та осіб з імунодефіцитами [279, 280]. Норовіруси в даний час вважають найчастішою причиною спорадичних випадків і спалахів ГКІ в світі. За даними мета-аналізу за 2008-2014 рр., сумарна частота норовірусної інфекції у пацієнтів з ГКІ склала 17-20 %, незалежно від віку хворих [281]. Аналогічні дані отримані при мета-аналізі її частоти в країнах, що розвиваються, за 1990-2016 рр.: там вірус Норфолк був причиною 15-18 % всіх випадків ГКІ, незалежно від віку, статі та соціального статусу людини [282, 283].

Серед коліфагів найбільш вивченими є дві групи: соматичні коліфаги, які інфікують штами кишкових паличок через рецептори клітинних стінок і F-специфічні РНК-бактеріофаги, які інфікують штами *E. coli* та споріднені бактерії через F- або секс-пілі [284]. За даними літератури, з фекалій людей F-специфічні фаги виділяються рідко. Хоча існують повідомлення, в яких йдеться про можливість присутності таких вірусних агентів у 10-20% людських фекальних мас. Натомість в деяких тварин присутність фагів в фекаліях може досягати 70% [285, 286]. На сьогоднішній день адекватного пояснення такому факту не запропоновано. Натомість, за нашими даними, з об'єктів зовнішнього середовища F-специфічні фаги виділяються часто, наприклад, 66,7 % проб стічної води, які були відібрані із зливного каналу на

Бортницькій станції аерації м. Києва, містили F-специфічні РНК-бактеріофаги. Концентрація фагів у цих зразках коливалася в межах від $1,0 \times 10^3$ до $2,45 \times 10^4$ БУО/л [267].

Результати наших досліджень, направлені на індикацію колифагів в зразках фекалій, отриманих від різних категорій осіб, в тому числі і осіб з дисбіотичними порушеннями, дозволили встановити наступне. Частота виділення бактеріофагів в обох категорій осіб була надзвичайно низькою і становила від 3,62 % в осіб з дисбіозом до 4,8% в матеріалі від осіб, в яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіозу. Середня концентрація F – специфічних фагів складала $3,6 \times 10^2 - 6,6 \times 10^3$ БУО/л в осіб з дисбіозом, а в осіб з відсутністю дисбіотичних проявів вона становила $1,1 \times 10^2 - 4,47 \times 10^3$ БУО/л (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

Частота виділення F-специфічних фагів кишкової палички в залежності від наявності дисбіотичних розладів

	К-ть досліджених зразків	К-ть виділених F-специфічних фагів кишкової палички (фаги MS ₂)	% виділених фагів по відношенню до загальної к-ті зразків
Дисбіоз	386	14	3,62
Відсутність дисбіозу	354	17	4,8

Після проведення накопичення фагів в культурі хазяїна *E. coli K12* та подальшої електронно-мікроскопічної ідентифікації встановлено, що дані вірусні агенти є типовими фагами, які за морфологічними особливостями і за морфологією бляшок повністю відповідали MS₂ фагам кишкової палички (рис. 3.12 – 3.13).

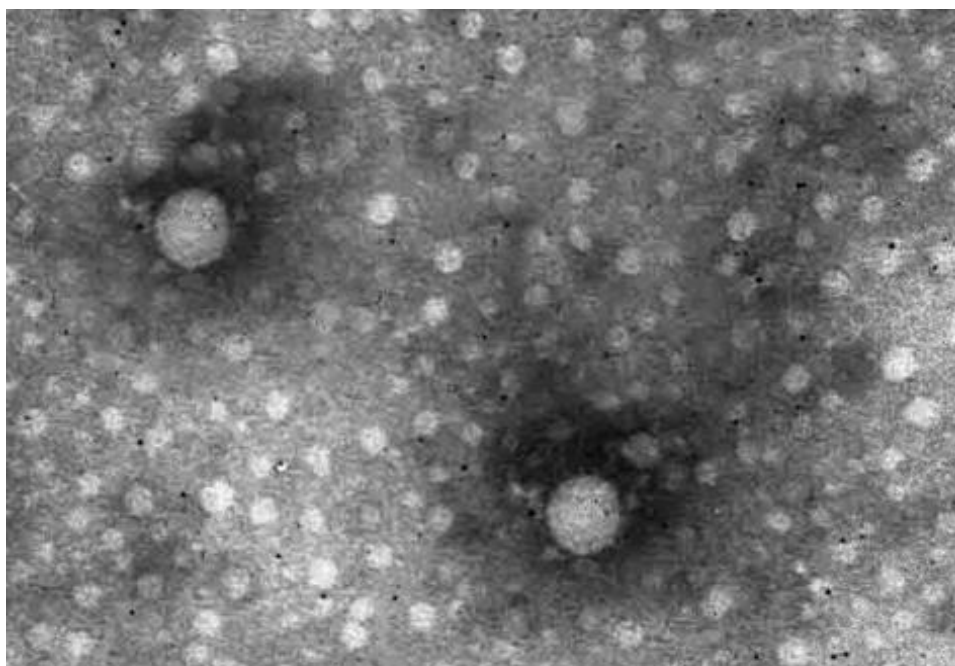


Рис. 3.12. F-специфічні бактеріофаги кишкової палички. Контрастування 2% ФВК (рН 6,0). Електронна мікроскопія, збільшення 60 000.

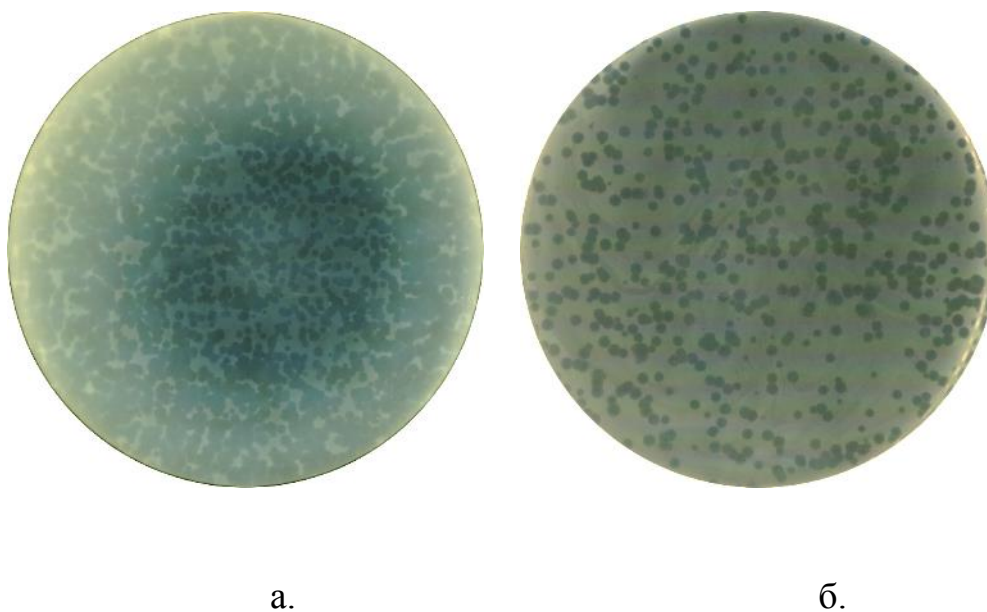


Рис. 3.13. Бляшки F-специфічних бактеріофагів: а) виділені від осіб з дисбіозом, б) від здорових осіб.

Бактеріофаги виділяли в низьких концентраціях у всіх досліджуваних категоріях осіб: у здорових з частотою 3,03%, в осіб, які мали порушення з

боку шлунково-кишкового тракту, частота виділення бактеріофагів становила 4,59 % ($p < 0,05$), (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Частота виділення F-специфічних фагів кишкової палички в залежності від наявності розладів з боку шлунково-кишкового тракту

	К-ть досліджених зразків	К-ть виділених F-специфічних фагів кишкової палички (фаги MS ₂)	% виділених фагів по відношенню до загальної к-ті зразків
Група осіб з розладами з боку ШКТ	434	19	4,37
Патологія позакишкової локалізації	174	8	4,59
Здорові люди	132	4	3,03

Таким чином, і концентрація, і частота реєстрації бактеріофагів в обох категоріях досліджуваних осіб була приблизно однаковою, тому говорити про певні закономірності виділення бактеріофагів та розвитку дисбіотичних порушень чи кишкових розладів, а також закономірності частоти реєстрації бактеріофагів та ентеровірусів на сьогодні не можна. Що стосується зв'язку між частотою виділення коліфагів та наявністю чи відсутністю патології з боку кишкового тракту, то тут теж достовірну закономірність встановити не вдалось.

3.4 Поширеність вірусів Норфолк в осіб з дисбіозом

В контексті поставлених нами завдань, необхідним стало дослідити розповсюдження не тільки бактеріофагів, а й інших кишкових вірусів, зокрема вірусів Норфолк, у людей з дисбіозом. Поставлене завдання було реалізовано шляхом постановки імуноферментного аналізу (ІФА), що передбачає виявлення антигену вірусу Норфолк у випорожненнях хворих. В експериментах було використано тест-систему Norwalk-like virus, виробництва R-biofarm (Німеччина). Для досліду відібрано 30 зразків, отриманих від дітей вікової категорії 6-7 років та 8-12 років з бактеріологічно підтвердженим «дисбіозом кишківника», 30 зразків від – хворих на ВІЛ-інфекцію та 30 зразків отримано від людей у яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичні порушення.

В групі осіб з дисбіотичними розладами (n=30) виявлено присутність вірусів Норфолк (23,3%), у порівнянні з групою порівняння (0%), (група з бактеріологічно не встановленим дисбіозом), (n=30), (p<0,01) (рис. 3.14) [287]. В жодному з досліджених зразків, отриманих від ВІЛ – інфікованих осіб, не відмічали присутності вірусів Норфолк, один з них знаходився у так званій «сірій зоні» (cut-off). У матеріалі, отриманому від здорових людей, антигенів вірусу Норфолк виявлено не було.

Таким чином, результати експериментальних досліджень показали, що у осіб з дисбіотичними порушеннями зростає частота реєстрації вірусів Норфолк.

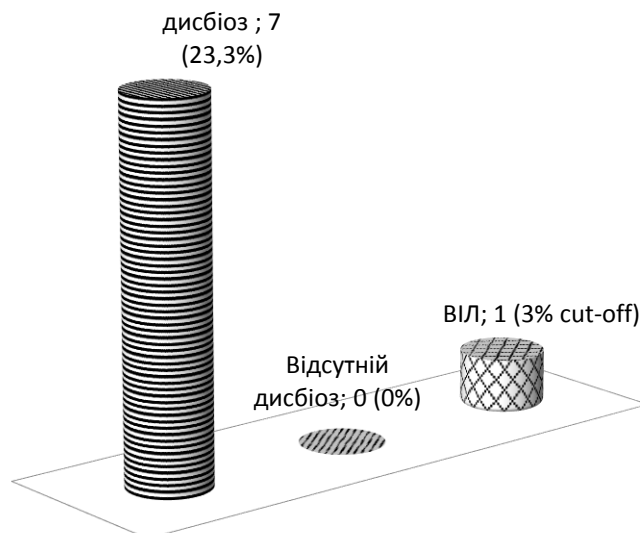


Рис. 3.14. Частота реєстрації антигену вірусу Норфолк у різних категорій осіб.

Слід відмітити, що мала кількість досліджуваних зразків не дозволяє проводити кореляційного аналізу поєднання глибини дисбіотичних порушень та присутності антигену вірусів Норфолк у матеріалі. Разом з тим, дослідження останніх років, в тому числі і наші дані, доводять особливу важливість і перспективність вивчення норовірусної інфекції в наш час як в Україні, так і в цілому у світі.

Висновки до розділу 3.

Вивчено тенденції поширення цитопатогенних агентів та ентеровірусів у різних категорій людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами. Показано, що частота реєстрації ЦПА в матеріалі від осіб з дисбіозом обернено пропорційна ступеню дисбіотичних порушень. Встановлено зростання частоти виділення ентеровірусів у осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника (з 386 досліджених зразків виділено 34 штами ентеровірусів, з них поліовірусів – 24, вірусів Коксакі В – 7, вірусів ЕСНО – 3, виявились нетипованими – 5 штамів) в порівнянні з особами, в яких бактеріологічно не підтверджено порушень мікробіоценозу кишківника (з

досліджених 354 зразків виділено 12 штамів ентеровірусів, серед них нетиповані ентеровіруси (6 штамів), поліовіруси (група С) (4 штами), та віруси Коксакі В (група В) (2 штами).

Доведено, що поліовіруси найчастіше реєструються у віковій категорії 1-2, 6-7 р. та 14-15 р., віруси Коксакі – у вікових категоріях 1-2 та 3-5 років, віруси ЕСНО частіше виділяють від дорослих, а нетиповані зустрічають практично у всіх досліджених вікових групах. Встановлено також можливість здорових осіб виділяти ентеровіруси: з 132 зразків від здорових осіб, ентеровіруси виділено у 2 випадках. Разом з тим, в осіб з ВІЛ не відмічено зростання частоти реєстрації ентеровірусів.

Крім того, вперше вивчено питання присутності F-специфічних колифагів у зразках фекалій, отриманих від людей, в тому числі і з дисбіотичними розладами. Показано, що частота виділення бактеріофагів від людей в цілому є низькою (від 3,62 % до 4,8%) і не залежить від ступеню дисбіотичних порушень.

Досліджено поширеність вірусів Норфолк (родина *Caliciviridae*, рід *Norovirus*) у різних категорій осіб, в тому числі і осіб з дисбіотичними порушеннями. Встановлено, що у хворих на ВІЛ-інфекцію не відмічається зростання частоти присутності вірусів Норфолк. Разом з тим, підтверджено зростання частоти реєстрації вірусів Норфолк в осіб з дисбіотичними розладами. Це ставить питання про причинний зв'язок між цими вірусами та розвитком дисбіозу. Зроблено висновок про перспективність глибокого вивчення поширення норовірусної інфекції в нашій країні, особливо серед дітей.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Бобир В. В. Ентеровіруси при дисбіотичних порушеннях кишківника. 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.

2. 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. Ponyatovski. Preventive medicine. 2012. №1 (17). P. 22–25.

3. Бобир В. В., Понятовський В. А. Ентеровіруси у хворих з ВІЛ/СНІД Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. №1 (04). 2011. Київ, 29-30 березня 2011р. С. 91-92.

4. Понятовський В. А., Бобир В. В., Ширококов В. П. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції для виявлення ентеровірусів. Профілактична медицина. 2012 р. № 3–4. С. 33–36.

5. 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.

6. Понятовський В. А., Бобир В. В., Ширококов В. П. Очищення стічних вод від ентеровірусів та бактеріофагів на спорудах Бортницької станції аерації. Мікробіологічний журнал. 2014. № 2. С.53-58.// Мікробіологічний журнал. 2014

7. 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 2011р. Український науково-медичний журнал. Спеціальний випуск 2011. №3. С. 211-212.

8. Сравнительная оценка методов детекции энтеровирусов из сточных вод / В. А. Понятовский, В. П. Ширококов, 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.

9. 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.

РОЗДІЛ 4

ГЕНОТИПОВІ ТА ФЕНОТИПОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІД ОСІБ З ДИСБІОЗАМИ

Численні відмінності у популяції ентеровірусів сьогодні можна вивчити шляхом аналізу їх генетичних маркерів вірулентності. Найчастіше такі генетичні маркери вивчають з урахуванням диференціації штамів на вірулентні та авірулентні [288, 289, 290]. Дослідження в цьому напрямку тим більш важливі з огляду на здатність вакцинних штамів поліовірусів до реверсії вірулентності. Такі віруси-реверсанти можуть циркулювати в людській популяції та навіть викликати інфекційний процес [291, 292]. Разом з тим, існують наукові повідомлення про можливість використання згаданих маркерів для визначення ступеня вірулентності та фенотипових властивостей неполіомієлітних ентеровірусів [264]. Аналіз зазначених маркерів у клінічних ізолятів ентеровірусів має на меті не лише визначення ступеню вірулентності, як фенотипової характеристики ізолятів, яка, безумовно, базується на генетичних засадах. Спільність ознак за маркерами вірулентності може вказувати на формування особливої групи ентеровірусів, які можуть виступати в ролі тригерних факторів у структурі формування дисбіотичних порушень.

Поміж сучасних методів диференціації штамів вірусу поліомієліту за вірулентністю чи не основними залишаються молекулярно-генетичні дослідження з детекцією заміни нуклеотидних послідовностей (ПЛР-ампліфікація РНК ентеровірусів, часткове секвенування, метод олігонуклеотидних відбитків, молекулярна гібридизація РНК із специфічними синтетичними ДНК-зондами) [292]. Водночас вони є достатньо громіздкими і коштовними методами, які потребують відповідного обладнання та здебільшого є недоступними для практичних лабораторій. Крім того, генетичні методи визначення внутрішньотипових відмінностей ентеровірусів були розроблені в основному для диференціації вакцинних та «диких» штамів

поліовірусів і майже не вивчались з позиції оцінки вірулентності неполіомієлітних ентеровірусів.

Аналіз генетичних маркерів вірулентності клінічних ізолятів різних видів ентеровірусів, як і ізолятів, виділених з навколишнього середовища, є також важливим епідеміологічним показником, спрямованим на визначення тривалості знаходження одного і того ж штаму в певній популяції людей. Так, наприклад, виділення штамів ентеровірусів з однаковими генетичними маркерами може свідчити про спільне джерело інфікування. Виділення одного й того ж типу, але з різними генетичними властивостями, вказує на появу нових джерел ентеровірусів даного серотипу [293]. В наших дослідженнях мета вивчення маркерів вірулентності у клінічних ізолятів була іншою – встановити можливий зв'язок частоти реєстрації однакових маркерів з формуванням дисбіотичних порушень.

Серед маркерів, які дозволяють оцінити вірулентність ізолятів ентеровірусів за фенотиповими ознаками, на практиці використовують наступні [249]:

1. Маркер N – знижена вірулентність для мавп.
2. Маркер M – особливості перебігу експериментального поліомієліту у мавп.
3. Маркер S – розміри бляшок, які утворюють віруси під бентонітовим чи агаровим покриттям.
4. Маркер D – здатність до репродукції вірусів за умов низьких концентрацій натрію гідрокарбонату у поживному середовищі.
5. Маркер gct40 – здатність розмножуватись в культурах клітин при температурних умовах 40°C.
6. Маркер MS – повільне розмноження на перещеплювальній культурі MS, одержаної із клітин нирки мавп.
7. Маркер H – знижена здатність утворювати бляшки на культурах клітин людини.

8. Маркер E – неповна елюція з діетиламіноетилцелюлози при промиванні фосфатним буферним розчином.

9. Маркер AI – підвищення стійкості до прогрівання протягом 60 хв. при +50° C у присутності 1–100 mM розчину алюмінію хлориду. Ця ознака є характерною для вакцинних поліовірусів 1 та 2 типу.

10. Бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}$) – здатність до сорбції вірусних часточок на бентоніті.

В нашій роботі використано декілька генетичних маркерів вірулентності, які сьогодні є найбільш вживаними і, на нашу думку, можуть максимально об'єктивно охарактеризувати вірулентність досліджуваних ізолятів: маркер gct_{40} , бентонітовий маркер та маркер S. Необхідність одночасного дослідження декількох генетичних маркерів вірулентності мотивується тим, що на основі аналізу лише одного з них не можливо однозначно диференціювати вірулентні та авірулентні штами [285].

На даному етапі виконання наукової роботи важливо було порівняльно вивчити «маркерні» особливості ентеровірусів, виділених від різних категорій осіб, в тому числі і з дисбіозами, та порівняти їх з лабораторними штамами, а також властивостями ентеровірусів, виділених з навколишнього середовища. Для порівняння використовували лабораторні штами ентеровірусів, які зберігали в рідкому азоті на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Дослідження маркуючої ознаки gct_{40} у штамів вірусів поліомієліту, виділених від осіб з дисбіозом, показали, що усі вони не здатні до розмноження при підвищених температурах, тобто мали ознаки авірулентних штамів (gct_{40}^-). Усі штами вірусів поліомієліту 1 типу, ізольовані від осіб, в яких бактеріологічно не зафіксовано порушень з боку нормальної мікрофлори кишківника, також мали негативні маркери gct_{40} .

Відповідно встановлено, що клінічні ізоляти поліовірусів 1 типу, виділені від осіб з дисбіозом, мали високі сорбційні властивості щодо бентоніту. В усіх 14 зразках реєструвались штами з високою сорбційною

здатністю (варіант $A_{\text{бенг}}^+$). За даними Копаниці Л. В., генетичні варіанти $A_{\text{бенг}}^+$ вірусів поліомієліту 1 типу належать до авірулентних штамів [294]. При дослідженні сорбційних властивостей поліовірусних ізолятів 1 типу, отриманих від осіб з відсутністю змін мікробіоценозу кишківника, встановлено, що за бентонітовим маркером усі зазначені штами були авірулентні (табл. 4.1).

Припускають, що у ентеровірусів прояв маркеру S під бентонітовим покриттям є прямо протилежний їх прояву під агаровим покриттям, де більш вірулентні штами індукують бляшки більшого розміру [245]. Порівняльний аналіз розмірів бляшок під бентонітовим покриттям, сформованих виділеними від осіб з дисбіозом поліовірусами першого типу показав, що дані штами здатні індукувати бляшки на культурі клітин НEr-2 через 48 год культивування з середнім розміром $2,5 \pm 0,3$ мм, що відповідало негативному маркеру S, характерному для авірулентних штамів. Слід відмітити, що всі ізоляти, виділені від осіб з непорушеною мікрофлорою, також мали негативний S маркер (табл. 4.1).

Подібні результати були отримані при дослідженні маркерів вірулентності вірусів поліомієліту 2 та 3 типу. Обидва ізоляти вірусу поліомієліту 2 типу, отримані від осіб з дисбіозом, при тестуванні на культурі клітин НEr-2 мали характеристику rc_{40}^- (табл. 4.2). Слід зазначити, що від людей з відсутніми дисбіотичними порушеннями кишківника поліовірусів 2 типу виділено не було. Серед восьми штамів поліовірусів 3 типу, виділених від осіб з дисбіозом, сім були не здатними до розмноження при підвищених температурах, тобто за цією ознакою належали до авірулентних штамів (rc_{40}^-), один штам (зразок 96) був віднесений до таких, які мали проміжну характеристику (rc_{40}^{\pm}). Єдиний ізолят вірусу поліомієліту 3 типу, виділений від осіб, у яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичних порушень, характеризувався як rc_{40}^- .

Таблиця 4.1

**Характеристика генетичних маркерів клінічних ізолятів вірусів
поліомієліту першого серотипу**

№	Лабор. номер	Дисбіоз	Маркер rct ₄₀	Бентонітовий маркер (A _{бент} ⁻)	S маркер
1	67	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
2	68	—	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
3	69	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
4	70	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
5	71	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
6	72	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
7	74	—	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
8	76	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
9	78	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	+
10	79	—	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
11	80	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
12	83	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
13	87	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
14	89	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
15	93	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
16	98	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—
17	104	+	rct ₄₀ ⁻	A _{бент} ⁺	—

Обидва клінічні ізоляти поліовірусів другого серотипу, одержані від осіб з відсутністю дисбіотичних розладів, належали до варіанту A_{бент}⁺ (табл. 4.2). Клінічний ізолят – вірус поліомієліту третього серотипу, виділений від здорових осіб, також проявляв виражені сорбційні властивості і був віднесений до генетичного варіанту A_{бент}⁺. З восьми ізолятів вірусів

поліомієліту 3 типу, виділених від осіб з дисбіозом, усі мали позитивним бентонітовий маркер, характерний для авірулентних штамів (табл. 4.2). В цілому, аналіз здатності виділених штамів поліовірусів до сорбції на бентоніті показав відсутність статистично підтвердженої кореляції між частотою реєстрації даного генетичного маркера та станом мікробіоценозу кишківника.

Таблиця 4.2

**Характеристика генетичних маркерів клінічних ізолятів вірусів
поліомієліту другого та третього серотипу**

№	Серотип	Дисбіоз	Маркер rct_{40}	Бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}$)	S маркер
1	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
2	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
3	3	—	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
4	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
5	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
6	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
7	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
8	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
9	3	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
10	2	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—
11	2	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	—

З восьми поліовірусних ізолятів другого типу, виділених від осіб з порушенням мікробіоценозу кишківника, позитивний маркер S не зафіксовано в жодному випадку.

Серед ізолятів вірусів Коксакі В, виділених від осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника, більше половини були наділені здатністю до розмноження в культурі клітин HEp-2 при підвищеній

температурі (rct_{40}^+). Два штами характеризувались як віруси з проміжною характеристикою (rct_{40}^\pm), один ізолят за даними властивостями був визначений як авірулентний (табл. 5.3). Натомість, поміж двох виділених вірусів Коксакі В від людей, в яких бактеріологічно не зафіксовано дисбіотичних порушень, жоден не мав здатності до розмноження при підвищених температурах, тобто обидва належали до варіанту rct_{40}^- . Отримані дані свідчать про можливе зростання здатності до репродукції за температури 40°C у клінічних ізолятів вірусів Коксакі В, виділених при дисбіотичних станах в порівнянні зі штамми, одержаними від осіб з непорушеним мікробіоценозом кишківника.

Віруси ЕСНО, виділені від осіб з дисбіозом, характеризувались різною здатністю до репродукції при 40°C . Один з них за цією ознакою позиціонували як вірулентний, два інші мали характеристику rct_{40}^- . В даному випадку відсутня можливість порівняти маркери досліджених штамів вірусів ЕСНО зі штамми, отриманими від осіб з непорушеним мікробіоценозом, оскільки таких ізолятів не було.

Серед клінічних ізолятів вірусів Коксакі В, виділених від осіб з дисбіозом, розподіл бентонітових варіантів був наступним: два з чотирьох штамів Коксакі В6 проявляли високі сорбційні властивості до бентоніту і належали до генетичного варіанту $A_{\text{бент}}^+$, інші два характеризувались як $A_{\text{бент}}^-$ (табл. 4.3). За результатами багаторічних досліджень, присвячених вивченню гетерогенності популяції ентеровірусів, прототипні штами вірусів Коксакі В6 були віднесені до генетичного варіанту $A_{\text{бент}}^+$ [245]. Виділені ж від осіб з дисбіозом ізоляти вірусів Коксакі В2 характеризувались низькими сорбційними властивостями відносно бентоніту, тобто представлені генетичним варіантом $A_{\text{бент}}^-$ і за вказаними властивостями відповідають прототипним «музейним» штамам вірусів Коксакі В2 (штам Ohio-1). Ізолят Коксакі В3 (лабораторний номер 63), виділений від осіб з дисбіозом, характеризувався як генетичний варіант $A_{\text{бент}}^-$, натомість його прототипний аналог мав виражені сорбційні властивості і належав до генетичного варіанту $A_{\text{бент}}^+$ (штам Nancy). Серед вірусів Коксакі В, які були виділені від осіб з

непорушеним мікробіоценозом кишківника, один ізолят – Коксакі В1, мав низькі сорбційні характеристики ($A_{\text{бент}}^-$), інший – Коксакі В5, навпаки, - добре зв'язувався з бентонітом, тобто належав до генетичного варіанту $A_{\text{бент}}^+$ (табл. 5.3). Обидва досліджених штами за зазначеними характеристиками повністю відповідали прототипним штамам Коксакі В-1 (штам Connecticut-5) та Коксакі В-5 (штам Faulkner).

Усі штами вірусів ЕСНО, одержані від осіб з дисбіозом, виявились не здатними до сорбції на бентоніті і характеризувались за цією ознакою як вірулентні (табл. 4.3). Ці результати корелюють з даними, представленими іншими дослідниками, в яких йдеться про те, що більш як 90 % ізолятів вірусів ЕСНО, одержаними від хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, та 63 % штамів вірусів ЕСНО, виділених від інших хворих, мали низьку здатність до сорбції на бентоніті, тобто належали до генетичного варіанту ($A_{\text{бент}}^-$) [288, 295].

Порівняти бентонітові маркери вірусів ЕСНО, виділених від осіб з дисбіозами та ізолятів від осіб зі збереженим кишковим мікробіоценозом неможливо, оскільки нами не було отримано від таких людей жодного штаму вірусів ЕСНО.

Таблиця 4.3

**Характеристика генетичних маркерів клінічних ізолятів вірусів
Коксакі В та ЕСНО**

№ п/п	Серотип	Дисбіоз	Маркер rct_{40}	Бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}$)	S маркер
1	Коксакі В6	+	rct_{40}^{\pm}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
2	Коксакі В3	+	rct_{40}^{-}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
3	Коксакі В6	+	rct_{40}^{\pm}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
4	Коксакі В6	+	rct_{40}^{+}	$A_{\text{бент}}^{+}$	-
5	Коксакі В6	+	rct_{40}^{+}	$A_{\text{бент}}^{+}$	-
6	Коксакі В2	+	rct_{40}^{+}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
7	Коксакі В2	+	rct_{40}^{+}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
8	Коксакі В5	-	rct_{40}^{-}	$A_{\text{бент}}^{+}$	-
9	Коксакі В1	-	rct_{40}^{-}	$A_{\text{бент}}^{-}$	-
10	ЕСНО	+	rct_{40}^{+}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
11	ЕСНО	+	rct_{40}^{-}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+
12	ЕСНО	+	rct_{40}^{-}	$A_{\text{бент}}^{-}$	+

Поміж семи клінічних ізолятів вірусів Коксакі В, виділених від осіб з порушенням мікробіоценозу кишківника, позитивний маркер S зафіксовано у п'яти випадках. Натомість, обидва клінічні ізоляти вірусів Коксакі В (Коксакі В5 та Коксакі В1), отримані від осіб з відсутністю дисбіотичних порушень, мали негативний маркер S. Отже, експерименти дозволили встановити зростання частоти реєстрації маркеру S в ізолятів вірусів Коксакі В у осіб з дисбіотичними порушеннями.

При порівнянні маркеру S у клінічних ізолятів вірусів Коксакі В6 від осіб з дисбіозом, та музейних штамів, які тривалий час культивували в лабораторії кафедри, встановлено, що лабораторні штами вірусів Коксакі В6 здатні утворювати великі бляшки ($3,51 \pm 0,52$) і мають негативний маркер S,

натомість усі клінічні ізоляти вірусів Коксакі В6 утворюють бляшки дрібного розміру ($1,36 \pm 0,64$), характерні для вірулентних вірусів (рис. 4.1).

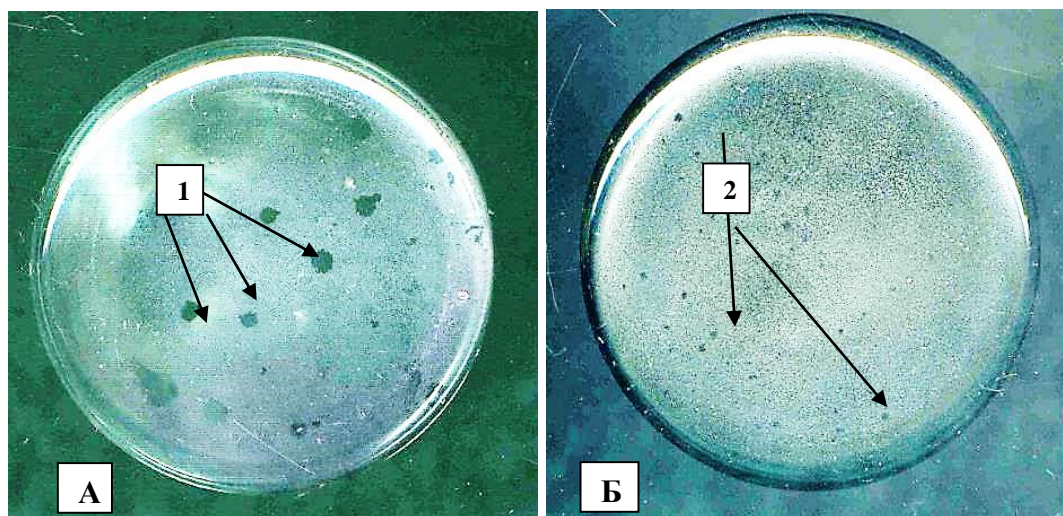


Рис. 4.1. Реакція бляшкоутворення під бентонітовим поживним покриттям у культурі клітин HEp-2. Час інкубації 48 год. А. Лабораторні штами; Б. Клінічні ізоляти. 1 – формування крупних бляшок не вірулентними штамами; 2 – утворення дрібних бляшок вірулентними штамами.

Не виключено, що зміна генетичних маркерів, зокрема бентонітового маркеру та маркеру S у штамів вірусів Коксакі В, отриманих від осіб з вираженими дисбіотичними порушеннями, може бути пов'язана з реалізацією вірусом певних адаптаційних механізмів, які здатні забезпечити зростання вірулентності. Усі три штами вірусів ЕСНО, виділені від осіб з дисбіозом кишківника, мали позитивний маркер S.

Найбільш виражено зростання здатності до репродукції при температурі 40°C проявлялось у нетипованих ентеровірусів. Серед них переважна кількість ізолятів, які за маркером $гст_{40}$ були вірулентними, виділені від осіб з дисбіотичними розладами. В даному випадку, чотири з п'яти нетипованих штамів можна характеризувати як такі, що мають позитивний маркер $гст_{40}$.

Натомість, серед ізолятів від осіб з відсутніми дисбіотичними порушеннями позитивний маркер rct_{40} було виявлено у двох випадках з шести досліджених зразків (табл. 4.4).

Поміж нетипованих штамів ентеровірусів, ізольованих від осіб з дисбіозом, чотири мали характеристику $A_{\text{бент}}^-$, один мав проміжні сорбційні властивості щодо бентоніту. Разом з тим, встановлено, що чотири з шести нетипованих вірусів, виділених від здорових осіб, за вказаним маркером належали до невірулентних штамів. Що стосується визначення S маркеру у нетипованих ентеровірусів, слід відмітити, що з п'яти клінічних ізолятів таких вірусів, отриманих від осіб з дисбіозом, позитивний маркер S зафіксовано у чотирьох, а поміж шести штамів від осіб з непорушеним мікробіоценозом – у двох зразків (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

**Характеристика генетичних маркерів клінічних ізолятів
нетипованих вірусів**

№ п/п	Лабор. номер	Серотип	Дисбіоз	Маркер rct_{40}	Бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}^-$)	S маркер
1	17	нетиповані	+	rct_{40}^+	$A_{\text{бент}}^-$	+
2	19	нетиповані	+	rct_{40}^+	$A_{\text{бент}}^-$	+
3	22	нетиповані	+	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^{\pm}$	+
4	23	нетиповані	+	rct_{40}^+	$A_{\text{бент}}^-$	–
5	26	нетиповані	+	rct_{40}^+	$A_{\text{бент}}^-$	+
6	27	Нетиповані	–	rct_{40}^+	$A_{\text{бент}}^+$	–
7	29	нетиповані	–	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^-$	+
8	30	нетиповані	–	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^-$	–
9	31	нетиповані	–	rct_{40}^+	$A_{\text{бент}}^+$	+
10	33	нетиповані	–	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	–
11	34	нетиповані	–	rct_{40}^-	$A_{\text{бент}}^+$	–

Отримані дані свідчать про найбільшу частоту реєстрації позитивних маркерів вірулентності саме у неідентифікованих ізолятів від осіб з дисбіотичними порушеннями. Слід відмітити, що серед нетипованих ентеровірусів, виділених із стічних вод м. Києва, також відмічали найбільшу кількість штамів з позитивним маркером S (табл. 4.5) [289].

Таблиця 4.5

Генетичний маркер вірулентності (маркер S) ентеровірусів виділених зі стічних вод м. Києва

№ п\п	Віруси	К-ть штамів	Кількість штамів із позитивними маркерами вірулентності S
1.	Поліомієліту	2	-
2.	Коксакі В	8	6
3.	Нетиповані	6	5

Аналіз частоти поєднання досліджуваних маркерів у клінічних ізолятів ентеровірусів показав, що 5 штамів із 51 використаного в експерименті, мали усі позитивні генетичні маркери вірулентності, з них два належали до Коксакі В, два до нетипованих вірусів та один до вірусів ЕСНО (табл. 4.6). Встановлено найвищий відсоток штамів з позитивними маркерами серед неідентифікованих ентеровірусів. У ізолятів даної групи 90 % ізолятів мали від одного до трьох позитивних маркерів. Серед вірусів Коксакі позитивні маркери зустрічались теж доволі часто – у більшій половині досліджених штамів. Найменша кількість таких штамів відмічалась у поліовірусів, в яких даний показник дорівнював 18%. Відзначимо, що невелика кількість досліджуваних ізолятів ентеровірусів (51 штамп) не дозволяє провести кореляційний аналіз поєднання фенотипових ознак вірулентності у досліджуваних вірусів.

Таблиця 4.6

Поєднання маркерів вірулентності у виділених ентеровірусів

№ п/ п	Віруси	Кількість штамів	Штами із позитивними маркерами					Всі негативні маркери	3 проміжними маркерами
			Лише один позитивний маркер	rct ₄₀ /S	A _{бенг} ⁻ /S	rct ₄₀ /A _{бенг} ⁻	rct ₄₀ /A _{бенг} ⁻ /S		
1.	Поліомієліт	28	5	0	0	0	0	23	5
2.	Коксакі В	9	4	0	2	0	2	1	2
3.	ЕСНО	3	0	0	2	0	1	0	0
4.	Нетиповані	11	5	1	2	1	2	0	2

Поміж усіх досліджених ентеровірусних ізолятів, отриманих від осіб з дисбіотичними розладами, хоча б один позитивний маркер реєстрували у 43 %, серед них поліовірусів – 12,8 %. Серед вірусів Коксакі В, ЕСНО та нетипованих штамів один з маркерів був позитивним у 100 % випадків. Натомість у штамів, виділених від людей зі збереженим мікробіоценозом кишківника, відповідний показник становив 33 %. Серед поліовірусів таких штамів не було зафіксовано, а серед ізолятів вірусів Коксакі та нетипованих ентеровірусів він дорівнював 50 %. Отримані дані свідчать про зростання частоти реєстрації позитивних генетичних маркерів вірулентності у штамів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями, особливо виразно ця різниця проявлялась у нетипованих штамів та вірусів Коксакі В.

Існують наукові повідомлення в яких йдеться про те, що найбільш інформативним маркером на вірулентність ентеровірусів є маркер rct₄₀, за ним бентонітовий маркер та маркер S [296, 297]. В нашому випадку найчастіше визначали позитивний маркер S (18 штамів виділених ентеровірусів), рідше

реєстрували бентонітовий та маркер rct_{40} (по 16 та 10 штамів виділених ентеровірусів) [298].

Аналіз генетичних маркерів дозволив зробити висновок про фенотипові характеристики виділених нами від осіб з дисбіозом ентеровірусів (рис. 4.2).

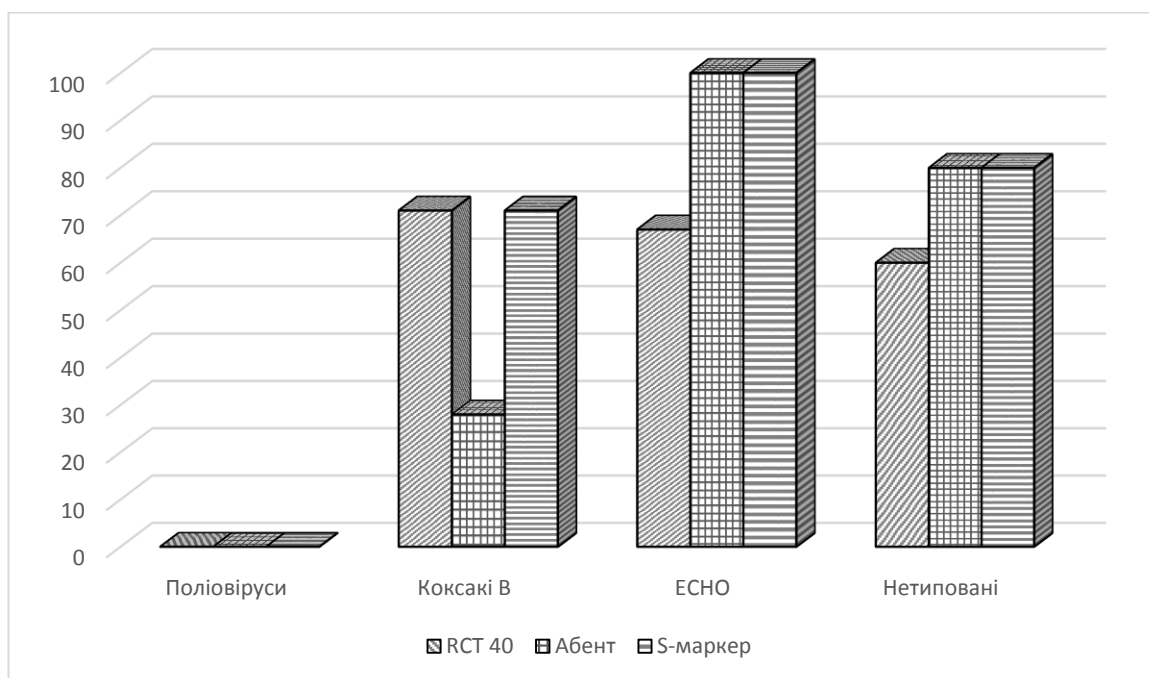


Рис. 4.2. Частота реєстрації генетичних маркерів (rct_{40} , $A_{бент}$ та S) у ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом.

Для більшості таких штамів вірусів Коксакі та нетипованих вірусів встановлено низький афінитет до бентоніту (маркер $A_{бент}^-$), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та у більшості випадків позитивний маркер rct_{40} . Це дає підстави рекомендувати визначення генетичних маркерів для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями.

При оцінці епідемічної небезпеки вірусних інфекцій великого значення набуло питання тривалості виживання ентеровірусів. Поліовіруси, як і інші ентеровіруси, характеризуються підвищеною стійкістю до дії різних фізико-хімічних факторів [292]. Значна стійкість до дії несприятливих фізичних та хімічних факторів дає можливість ентеровірусам тривалий час виживати в

різноманітних об'єктах зовнішнього середовища. Це питання особливо актуальне у зв'язку з тим, що віруси, завдяки своїм біологічним особливостям (облігатні внутрішньоклітинні паразити), не розмножуються у зовнішньому середовищі, а тільки перебувають у ньому [200]. Крім того, відомо, що вірулентні та атенуйовані штами вірусів поліомієліту відрізняються між собою за здатністю до репродукції при 40°C [292].

Нашим завданням було *in vitro* вивчити тривалість збереження клінічних ізолятів, отриманих від осіб з дисбіозом, та порівняти їх із аналогічними властивостями музейних прототипних штамів ентеровірусів. В якості прототипних штамів використано Коксакі В3 (штам *Nancy*) та Коксакі В6 (штам *Hammon*). Клінічні ізоляти вірусів Коксакі В3 та Коксакі В6 були отримані від осіб з бактеріологічно підтвердженими дисбіотичними порушеннями кишківника. Досліджувані проби витримували за температури: +4°C, +20°C, +37°C, відбір проводили на 3, 10, 18, 36, 60 та 90 добу від початку експерименту і здійснювали їх титрування класичним мікрометодом за цитопатичною дією [244].

Експерименти показали достатньо високу стійкість усіх досліджуваних вірусних популяцій при температурі +4°C, титр яких мало змінювався протягом 90 діб спостереження. Разом з тим, встановлено зростання резистентності у клінічних ізолятів ентеровірусів: через 90 діб зберігання при +4°C титр вірусів Коксакі В3 становив $2,75 \pm 0,17 \log \text{ТЦД}_{50}/50\text{мкл}$, натомість титр лабораторних штамів на 90 добу спостереження складав $1,0 \pm 0,1 \lg_{10} \text{ТЦД}_{50}/50\text{мкл}$ ($p < 0,05$). Титр Коксакі В6 дорівнював $2,5 \pm 0,13 \log \text{ТЦД}_{50}/50\text{мкл}$ та $1,5 \pm 0,12 \lg_{10} \text{ТЦД}_{50}/50\text{мкл}$ відповідно ($p < 0,05$) (табл. 4.7-4.9).

Резистентність ентеровірусів в цілому знижувалась при зростанні температури зберігання. Так, при 20°C більшість досліджуваних зразків інактивувались вже на 60 добу спостереження, хоча слід відмітити, що клінічні ізоляти проявляли дещо вищу стійкість за даних умов: нами виявлялись інфекційні віруси Коксакі В3 та В6 навіть на 60 добу спостереження. При температурі 37°C динаміка інактивації клінічних та прототипних штамів

вірусів Коксакі В3 та Коксакі В6 відбувалась практично однаково: вже на 36 добу зберігання у дослідних зразках інфекційних вірусних агентів зафіксовано не було [299]. Отже, в цілому, слід відмітити вищу резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В у порівнянні з їх «музейними» аналогами.

Таблиця 4.7

Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 4°C

Віруси		Доба					
		3	10	18	36	60	90
I	Коксакі В3	4,5±0,18	4,5±0,18	4,0±0,19	3,75±0,19	3,5±0,13	2,75±0,17
	Коксакі В6	4,5±0,18	4,25±0,20	4,0±0,19	3,5±0,20	3,0±0,15	2,5±0,13
II	Коксакі В3	4,5±0,18	4,25±0,20	4,25±0,20	3,0±0,20	2,25±0,16	1,25±0,1
	Коксакі В6	4,5±0,18	4,0±0,20	4,0±0,19	3,25±0,18	2,0±0,15	1,5±0,12

Примітки: Титр виражений в (log ТЦД₅₀/50мкл);

I – клінічні ізоляти; II – музейні прототипні штами.

Таблиця 4.8

Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 20°C (log ТЦД₅₀/50мкл)

Віруси		Доба					
		3	10	18	36	60	90
I	Коксакі В3	3,25±0,18	2,25±0,15	1,75±0,16	1,0±0,11	0,5±0,12	-
	Коксакі В6	3,5±0,19	2,5±0,16	1,75±0,14	1,25±0,16	0,5±0,13	-
II	Коксакі В3	3,0±0,17	2,0±0,18	1,5±0,20	0,5±0,14	-	-
	Коксакі В6	3,0±0,18	1,75±0,12	1,0±0,11	-	-	-

Примітки: Титр виражений в (log ТЦД₅₀/50мкл);

I – клінічні ізоляти; II – музейні прототипні штами.

Таблиця 4.9

Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 37°C (log ТЦД₅₀/50мкл)

Віруси		Доба					
		3	10	18	36	60	90
I	Коксакі В3	3,0±0,16	2,25±0,16	1,25±0,12	-	-	-
	Коксакі В6	3,25±0,18	2,0±0,16	1,0±0,11	-	-	-
II	Коксакі В3	3,0±0,14	2,0±0,14	1,0±0,12	-	-	-
	Коксакі В6	3,0±0,12	2,0±0,12	0,75±0,12	-	-	-

Примітки: Титр виражений в (log ТЦД₅₀/50мкл); I – клінічні ізоляти; II – музейні прототипні штами.

Ці результати корелюють з повідомленнями про зростання стійкості вірусів, виділених з об'єктів навколишнього середовища, зокрема зі стічних вод, у порівнянні з лабораторними штамми. Дослідники пов'язували це з присутністю в них органічних речовин та адсорбцією вірусу на завислих частках, а також не виключали, що різні фізико-хімічні фактори, під дію яких можуть підпадати ентеровіруси в навколишньому середовищі, можуть сприяти відбору з гетерогенної популяції найбільш стійких варіантів вірусів та закріпленню цієї ознаки у них в подальшому [297].

Разом з тим, спираючись на отримані нами результати, можна казати про зниження резистентності клінічних ізолятів вірусів Коксакі В після їх культивування у культурах клітин: резистентність клінічних штамів вірусів Коксакі В після 6-ти кратного пасажування у культурі клітин HEp-2 в умовах зберігання при +4°C не відрізняється від резистентності лабораторних штамів (рис. 4.3) [299]. Крім того, в контексті представлених порівняльних досліджень вивчено вплив тривалості пасажування клінічних ізолятів у культурах клітин на їх резистентність при зберіганні за температури +4°C.

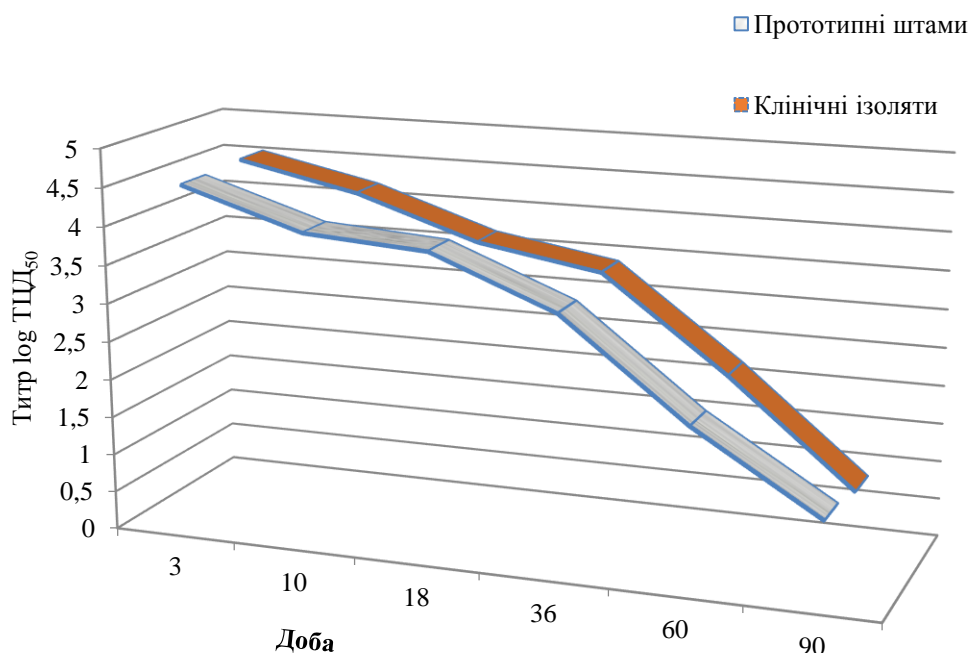


Рис. 4.3. Резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В3 після 6-кратного пасажування у культурі клітин +4°C.

Порівняльний аналіз здатності до репродукції при підвищених температурах поліовірусних ізолятів, отриманих від осіб з дисбіотичними розладами та від здорових людей, описаний вище, показав неможливість диференціації зазначених штамів за ознакою t_{c40} . Водночас було показано, що за вказаними властивостями відрізняються штами вірусів Коксакі В та нетипованих вірусів. Нами проведено дослідження, направлені на аналіз тривалості збереження інфекційної активності ізолятів, отриманих від зазначених вище груп осіб при розширених температурних режимах, зокрема при +4°C, +20°C та +37°C (рис. 4.4 - 4.5).

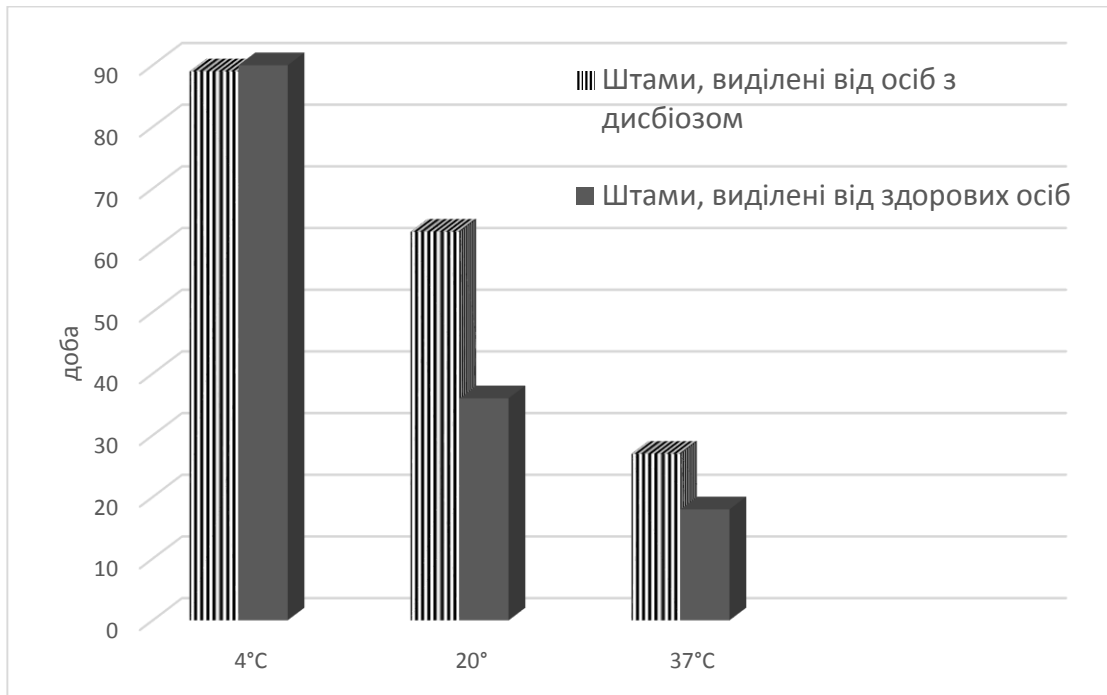


Рис. 4.4. Збереження інфекційності клінічних ізолятів вірусів Коксакі В при різних температурних режимах.

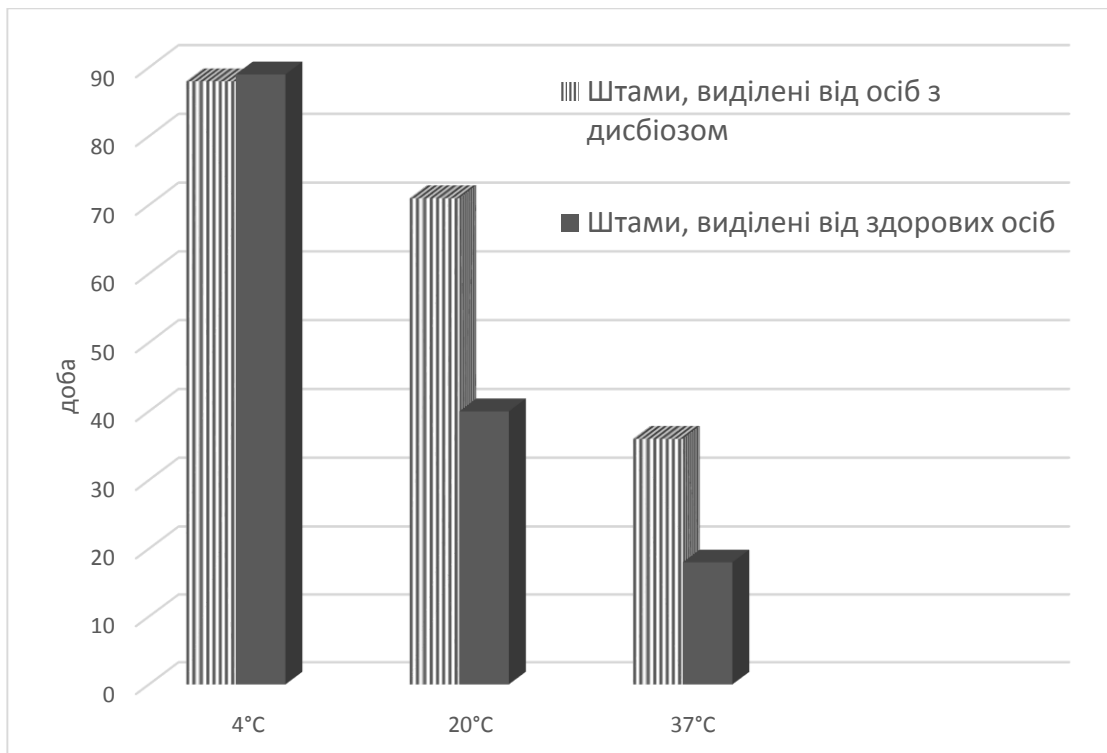


Рис. 4.5. Збереження інфекційності клінічних ізолятів нетипованих ентеровірусів при різних температурних режимах.

Одержані експериментальні дані свідчать про те, що при температурі +4°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 В та нетиповані штами, виділені від здорових людей, зберігались інфекційними протягом 36 та 40 діб відповідно, натомість тривалість збереження інфекційної активності у вірусів Коксакі В та нетипованих штамів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями зростала практично удвічі. Подібна закономірність була зафіксована при порівняльному збереженні вказаних вірусів за температури $+37^{\circ}\text{C}$.

Висновки до розділу 4

Аналіз частоти реєстрації генетичних маркерів вірулентності (rct_{40} , маркер $\text{A}_{\text{бент}}$, маркер S) у поліовірусів дозволив віднести усі отримані ізоляти до авірулентних (вакцинних) штамів. За дослідженими маркерами диференціювати ізоляти поліовірусів, отримані від осіб з дисбіотичним 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 та нетипованих ентеровірусів, виділених при дисбіотичних станах, в порівнянні з штамми, отриманими від осіб з відсутністю дисбіотичних порушень.

Описано фенотипові характеристики нетипованих ентеровірусів отриманих від осіб з дисбіозом: низький афінитет до бентоніту (маркер $\text{A}_{\text{бент}}^{-}$), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та у більшості випадків позитивний маркер rct_{40} , що дає підстави рекомендувати їх визначення для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями.

Крім того, результати досліджень свідчать про підвищену резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В у порівнянні з лабораторними штамми, а також демонструють зниження стійкості клінічних ізолятів вірусів Коксакі В при їх тривалому пасажуванні у культурах клітин.

Аналіз тривалості збереження інфекційності при різних температурних режимах ізолятів вірусів Коксакі В та нетипованих штамів, виділених від здорових осіб та людей з дисбіозом показав їх диференціацію за вказаними властивостями. Зокрема, при температурі +20 та +37°C тривалість збереження штамів від осіб з дисбіозом зростала майже вдвічі, у порівнянні з штамами, отриманими від людей з непорушеним мікробіоценозом кишківника.

Основні наукові результати розділу висвітлені у наступних публікаціях:

1. 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.

2. 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.

3. 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.

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЯЦІЇ ТА ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНОЇ ВЕРИФІКАЦІЇ ЕНТЕРОВІРУСІВ ВІД ОСІБ З ДИСБІОЗОМ

Не зважаючи на бурхливий розвиток сучасних молекулярно-генетичних методів, вірусологічний метод продовжує залишатися надійним та ефективним способом діагностики вірусних інфекцій. Його вагомою перевагою є те, що, на відміну від інших, даний спосіб дозволяє не лише визначити наявність вірусів в матеріалі, а й вивчати їх біологічні властивості, зокрема, провести внутрішньотипову диференціацію, визначити вірулентність, імуногенні властивості тощо.

5.1 Вибір культур клітин для виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу

Найчастіше для виділення та ідентифікації ентеровірусів застосовують перещеплювані лінії культур клітин людини та деяких тварин, що наділені специфічними рецепторами ліпопротеїдної природи, на яких адсорбуються дані віруси. Результативність цього складного та тривалого методу в значній мірі залежить від вибору лінії культури клітин, яка буде використовуватися при виділенні та ідентифікації вірусних інфекційних агентів. У зв'язку з тим, що кількість таких ліній клітин, які використовуються в сучасній лабораторній практиці, постійно збільшується, існує нагальна необхідність проведення дослідження їх чутливості до вірусних агентів.

На сьогоднішній день визнано, що жодна клітинна культура не є універсальною для індикації всіх кишкових вірусів, зокрема ентеровірусів. Так, в результаті порівняльного дослідження чутливості перещеплюваних культур клітин (HEp-2, RD, Vero), одними вченими зафіксовано найбільшу чутливість клітин лінії RD до вірусів ECHO [300, 301]. На думку інших дослідників, які для ізоляції ентеровірусів використовували культури клітин

BGM, HEK, MRC-5, МК, найперспективнішою є культура клітин MRC-5 [302]. Деякі дослідники найкраще ізолювали поліовіруси на клітинах RD, віруси Коксакі А на культурах RD та HFDK, Коксакі В виділяли на BGM, а віруси ЕСНО на RD та RhМК. Нещодавно також зафіксовано практично однакову чутливість перещеплюваних клітин МФК, у порівнянні з первинно-трипсинізованими RhМК, які завжди вважали «еталоном» культур клітин за чутливістю до вірусних агентів [303]. В роботах Sheryl L. G. Johnston та Charles S. Siegel вивчено можливість використання клітин RD, HEp-2 для диференціації ентеровірусів, не застосовуючи реакцію віруснейтралізації, та показано можливість проведення первинної диференціації ентеровірусів на основі аналізу їх ЦПД в культурі клітин [304].

Ми також намагались підібрати оптимальну комбінацію ліній клітин, що можуть використовуватися для виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу, зокрема, з фекальних мас осіб, в анамнезі яких спостерігались порушення складу нормальної мікрофлори кишківника. З цією метою в процесі експериментальних досліджень вивчено чутливість наступних типів перещеплюваних культур клітин, які мають неоднакову чутливість до різних видів ентеровірусів:

- RD (клітини рабдоміосаркоми людини) – чутливі до поліовірусів, вірусів ЕСНО та деяких штамів Коксакі А (за виключенням А1, А19, А22), ентеровірусів 68-101;
- HEp-2 (клітини карциноми гортані людини) – добре розмножуються поліовіруси та віруси Коксакі В;
- Vero (клітини нирки африканської мавпи) – активно розмножуються віруси поліомієліту, Коксакі В та більшість серотипів вірусів ЕСНО;
- HeLa (карцинома шийки матки людини) – віруси Коксакі В, поліовіруси, віруси ЕСНО;
- L20В (лінія мишачих клітин, яким генно-інженерним шляхом надана властивість експресувати рецептори до поліовірусу). Дані клітини

високочутливі до поліовірусу, хоча деякі неполіомієлітні ентеровіруси також здатні до розмноження в них (Коксакі А 4, 8, 10);

- L41 (мишачі фібробласти), розмножуються неполіомієлітні ентеровіруси.

Дослідження проводили у декілька етапів. На першому етапі було вивчено особливості розвитку цитопатогенної дії клінічних ізолятів ентеровірусів у різних типах культур клітин. Для цього відібрано 87 зразків, які проявляли ЦПД у будь-якій з вище представлених типів клітин.

Експерименти дозволили встановити, що у 65 % випадків початкові ознаки ЦПД реєструються через 24-48 год після внесення досліджуваного матеріалу і найчастіше супроводжуються подвійним світлозаломленням цитоплазми клітин, появою зернистості з подальшим їх вираженим округленням. Рідше, у 35 % випадків, початок ЦПД (потемніння цитоплазми клітин, округлення клітин та утворення скупчень у вигляді грон винограду, симпластів або синцитіїв) реєстрували через 48 і більше годин (рис. 5.1 А, Б). Певних закономірностей розвитку цитопатогенної дії і її зв'язку з дисбіотичними порушеннями у досліджуваних осіб зафіксовано не було.

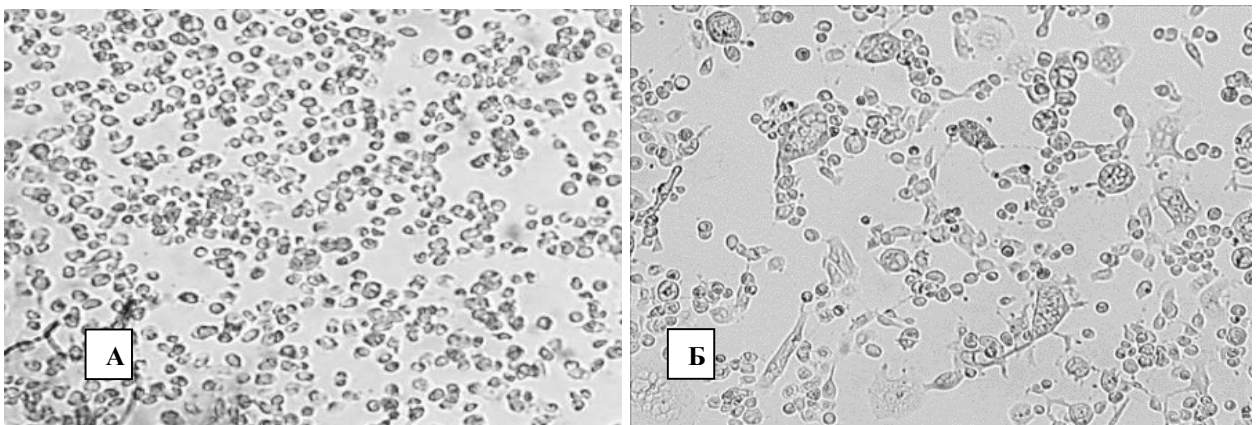


Рис. 5.1. Світлова мікроскопія. Культура клітин HEp-2.

А. Цитопатогенна дія: подвійне світлозаломлення цитоплазми клітин, зернистість клітин та виражене округлення. Б. Цитопатогенна дія: потемніння цитоплазми, округлення клітин, утворення скупчень у вигляді грон винограду, симпластів та синцитіїв. Збільшення $\times 80$.

Чутливість культури клітин до ентеровірусів оцінювали за ступенем прояву ЦПД через різні проміжки часу при інфікуванні моношарів досліджуваними зразками, а ступінь деструкції моношарів клітин виражали у відсотках. Результати виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу на різних лініях перещеплюваних культур клітин представлена в табл. 5.1.

Із 51 зразків, в яких методом полімеразної ланцюгової реакції було зафіксовано присутність ентеровірусної РНК, в 35 випадках вдалось виділити вірусні інфекційні агенти. Зокрема, поліовіруси – 28 штамів, з них 1 типу – 22 штами, 2 типу – 2 штами, 3 типу – 4 штами; віруси Коксакі В – 5 штамів (Коксакі В6 – 3 штами, та по одному штаму вірусів Коксакі В3 та Коксакі В2), віруси ЕСНО-2 штами. Разом з тим, 9 ізолятів не нейтралізувалися жодним з наборів використаних діагностичних сироваток і були віднесені до групи нетипованих ентеровірусів [305].

Таблиця 5.1

Ефективність виділення ентеровірусів з клінічного матеріалу на різних лініях перещеплюваних культур клітин

Культура клітин	Кількість позитивних зразків	% від загальної кількості зразків	Вид ентеровірусів, що виділялись
HEp-2	32	62,74%	Поліовіруси 1-3 типу, нетиповані віруси, Коксакі В3, Коксакі В6, ЕСНО
RD	21	41,18%	Поліовіруси 1 типу
Vero	18	35,3%	Поліовіруси 1 та 3 типу, Коксакі В3
L20B	17	33,3%	Поліовіруси 1-3 типу, нетиповані віруси
HeLa	23	45,0%	Поліовіруси 1 та 3 типу, Коксакі В2, В6
L-41	5	9,8%	Поліовіруси 2 типу, нетиповані віруси

Експериментально 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 (рис. 5.2). Найінтенсивніше цитодеструкція проявлялася на клітинах НЕр-2. Вже через 24 годин після інфікування моношару з'являлися характерні ознаки репродукції ентеровірусів (ЦПД супроводжувалась подвійним світлоломленням цитоплазми клітин, появою зернистості з подальшою круглоклітинною дегенерацією моношару).

Усі шість використаних типів культур клітин проявляли високу чутливість при їх інфікуванні матеріалом, що містив віруси поліомієліту. Разом з тим, найбільш чутливими виявились культури клітин L20B та НЕр-2: вже через 48 год після інфікування наступала повна деструкція клітинного моношару. Порівняльний ряд чутливості клітинних культур до штамових ізолятів поліовірусів зафіксовано в такому порядку: L20B > НЕр-2 > HeLa > RD > Vero > L41 [305]. Віруси Коксаки В в основному виділялися на клітинах НЕр-2, HeLa та Vero (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

**Швидкість розвитку деструкції клітинного моношару при
інфікуванні клінічними ізолятами поліовірусів**

Культура клітин	12 год	24 год	36 год	48 год
RD	-	75%	90%	Повна деструкція у всіх лініях культур клітин
Vero	-	75%	90%	
L20B	25%	50%	75%	
HeLa	-	50%	100%	
HEp-2	-	90%	100%	
L-41	-	50%	75%	

% - кількість дегенерованих клітин моношару.

Порівняльно вивчали чутливість одних і тих самих типів культур клітин до клінічних ізолятів поліовірусів виділених від осіб з дисбіозом та штамів поліовірусів, виділених з навколишнього середовища, зокрема, зі стічних вод. Для цього спочатку було відібрано 31 пробу стічних вод, позитивну щодо наявності ентеровірусної РНК в ПЛР. Далі позитивні зразки паралельно досліджували на 5 лініях клітинних культур. Чутливість культури клітин до ентеровірусів із навколишнього середовищ (стічної води) оцінювали за інтенсивністю прояву ЦПД через різні проміжки часу.

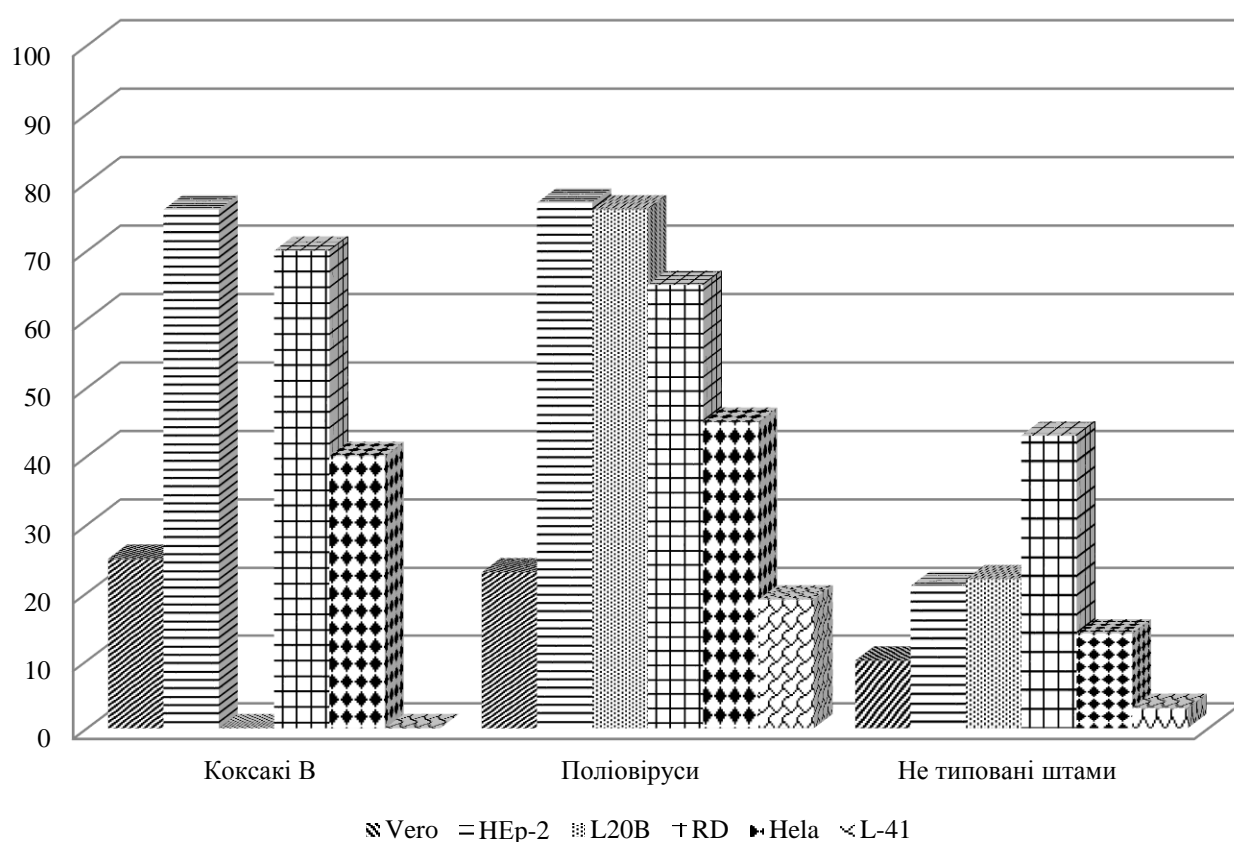


Рис. 5.2. Порівняльна характеристика чутливості клітинних культур до клінічних ізолятів ентеровірусів.

При дослідженні зразків, що містили поліовіруси, усі використані типи культур клітин дали позитивні результати. Найвищу чутливість відмічали у культурі клітин L20B (табл. 5.3). В даному випадку вже через 36 год після

інфікування наступала повна деструкція моношару клітин. Порівняльний ряд чутливості клітинних культур до ізолятів поліовірусів із зразків стічної води можна розмістити в такій послідовності: L20B > HEp-2 > RD > HeLa > Vero. Отримані результати – порівняльний ряд чутливості різних типів культур клітин до ізолятів поліовірусів з навколишнього середовища, близькі до результатів їх чутливості до клінічних ізолятів (L20B> HEp-2> HeLa> RD> Vero> L41). Лише культура клітин HeLa мала вищу чутливість до клінічних ізолятів, натомість для виділення ентеровірусів із стічних вод нами рекомендовано надавати перевагу культурі клітин RD [377].

Таблиця 5.3

Чутливість різних культур клітин до поліовірусів, виділених із зовнішнього середовища (стічні води)

Клітинна культура	Ступінь деструкції клітинного моношару					
	12 год.	24 год.	36 год.	48 год.	60 год.	72 год.
Vero	-	-	25%	50%	75%	100%
HEp-2	-	50%	90%	100%	-	-
L20B	20%	70%	100%	-	-	-
RD	-	40%	75%	100%	-	-
HeLa	-	25%	50%	75%	100%	-

Проведений порівняльний аналіз цитодеструктивної активності клінічних ізолятів вірусів та їх прототипних (музейних) штамів показав, що при однаковій інфікуючій дозі вірусів Коксакі В6 ($6,25 \pm 0,15$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл) та вірусів поліомієліту ($6,5 \pm 0,12$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл) прояв цитопатогенної дії клінічних ізолятів суттєво поступається 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 (табл. 5.4).
Всі отримані результати є достовірними ($P \leq 0,05$).

Таблиця 5.4

Порівняльна чутливість різних типів культур клітин до клінічних ізолятів та лабораторних штамів ентеровірусів

Культур и клітин	Віруси							
	Коксакі В6 (лабораторний штам)		Коксакі В6 (ізолят)		Вірус поліомієліту 1 типу (лабораторни й штам)		Вірус поліомієліту 1 типу (ізолят)	
	Ступінь деструкції клітинного моношару, %							
	12 год	24 год	12 год	24 год	12 год	24 год	12 год	24 год
RD	25%	75%	0%	50%	25%	90%	0%	75%
Vero	0%	75%	0%	60%	25%	90%	0%	75%
L20B	0%	0%	0%	0%	25%	50%	50%	75%
HeLa	25%	80%	0%	50%	0%	50%	0%	50%
HEp-2	30%	90%	0%	90%	25%	100%	0%	90%
L41	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%	50%

Подібні результати були отримані і з поліовірусами. Так, після інфікування лабораторними штамми вірусів поліомієліту 1 типу (штам Lsc2ab) у таких лініях культур клітин, як HEp-2, RD, Vero, L20B розвиток ЦПД спостерігався вже через 12 годин, в той час, як після інфікування клінічними ізолятами початок розвитку ЦПД після 12 годин спостереження зафіксовано лише на культурах клітин L20B. Цитодеструктивна активність лабораторних

штамів на деяких культурах клітин через добу сягала 90% деструкції моношару. Всі отримані результати є достовірними ($P \leq 0,05$) [305].

На підставі одержаних результатів досліджень можна зробити наступні висновки: по-перше, чутливість кожної культури клітин до різних типів ентеровірусів, виділених з клінічного матеріалу, неоднакова, через це раціональним є використання комбінації декількох клітинних культур. По-друге, оптимальною комбінацією для проведення моніторингу ентеровірусних інфекцій є культури клітин L20В, на яких добре виділяються поліовіруси, та НEr-2, що є найбільш чутливими при виділенні інших видів ентеровірусів. Цю комбінацію можна рекомендувати для швидкого виділення та ідентифікації ентеровірусів з фекальних мас. Разом з тим, серед досліджуваних ліній культури клітин Vero та L41 були найменш чутливими при виділенні ентеровірусів з клінічного матеріалу.

5.2 Порівняльна оцінка методів концентрування ентеровірусів для проведення електронно-мікроскопічної верифікації

Можливості сучасної електронної мікроскопії здатні забезпечити значний стрибок у розвитку вірусології як науки. З залученням електронно-мікроскопічних методів дослідження вдалось з'ясувати макромолекулярну будову та особливості морфогенезу цілої низки вірусних агентів [306; 307]. Сьогодні в цивілізованих країнах електронна мікроскопія широко використовується як надійний метод ідентифікації вірусних агентів.

Разом з тим, дослідження ентеровірусних ізолятів передбачає вибір досконалих та ефективних методичних підходів до проведення електронно-мікроскопічного дослідження. Це в першу чергу пов'язано з низьким титром вірусу (менше $6,0 -\log \text{ТЦД}_{50}/100 \text{ мкл}$). За таких умов виявити віруси та ідентифікувати їх структурно-морфологічні особливості доволі складно, тому для отримання позитивних результатів використовують концентрування вірусомісного матеріалу. Більшість відомих способів концентрації потребують не лише специфічних реактивів, додаткового вартісного

обладнання, але й значних затрат часу. Через це, одним з принципових завдань, які стосуються ефективного ЕМ дослідження ентеровірусів, і особливо клінічних ізолятів, виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями, є проведення порівняльної оцінки способів концентрування з метою вибору найбільш ефективного, доступного та дешевого.

Для реалізації поставленого завдання нами проведено порівняльну оцінку наступних способів концентрування: адсорбційні – бентонітом; фізико-хімічні – за допомогою ПЕГ-6000 в присутності хлористого натрію і концентрування вірусів з використанням двофазного розділення (метод рекомендований ВООЗ), а також фізичні – шляхом ультрацентрифугування. Оцінку ефективності концентрування вірусних ізолятів здійснювали за двома показниками: за результатами подальшого титрування отриманого концентрату та за «чистотою» вірусних концентратів з можливістю одержання максимально якісних електронограм.

Результати експериментів показали, що усі випробувані способи є придатними для концентрування вірусомісного матеріалу з метою подальших ЕМ досліджень [308]. Разом з тим, фізичні способи концентрування з використанням центрифугування за показником титру вірусу в отриманих елюатах перевершували концентруючу здатність фізико-хімічних та адсорбційних методів. При електронно-мікроскопічній оцінці якості сконцентрованих об'єктів нами доведено, що даний спосіб має суттєві недоліки – після ультрацентрифугування вірусні часточки виявляли у складі відносно великих утворень (50-200 та більше віріонів) (рис. 5.3).

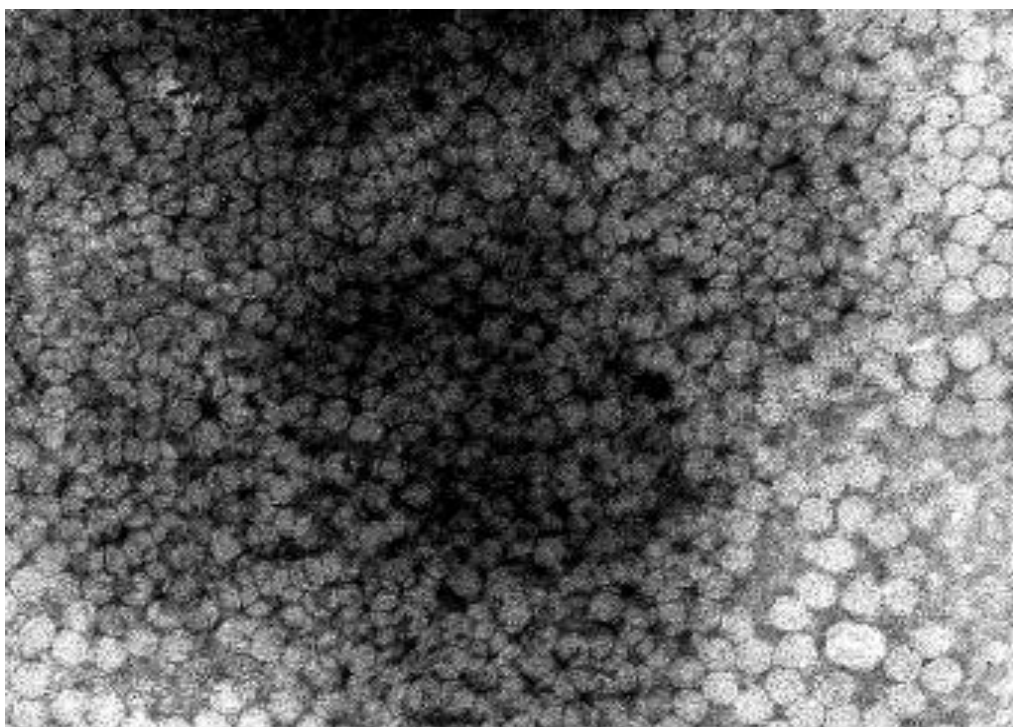


Рис. 5.3. Електронна мікрофотографія. Клінічні ізоляти вірусів поліомієліту 1 типу в складі кристалічних утворень. Концентрування ультрацентрифугуванням. Контрастування 1% ФВК (рН 6,0). Збільшення 60 000×.

Такі агреговані формування, як правило, дуже нерівномірно розподілялись у препараті, що створювало значні труднощі в їх пошуку на плівці-підложці.

Спосіб концентрування ПЕГом-6000 теж дозволяє отримати високі титри концентрату вірусів, але в таких зразках, як і в попередніх, також спостерігалась значна кількість забруднюючих речовин. Очевидно, це пов'язано зі здатністю ПЕГу з молекулярною масою 6000 Да осаджувати макромолекулярні комплекси із розчинів, через що при використанні ПЕГу-6000 для концентрування вірусів, на плівках-підложках поряд із вірусними частками може спостерігатись велика кількість неспецифічних забруднювачів (рис. 5.4). Забруднюючі речовини заважають об'єктивно ідентифікувати

вірусні агенти, до того ж, значним недоліком даного методу концентрування вірусів є велика тривалість (12-24 год).

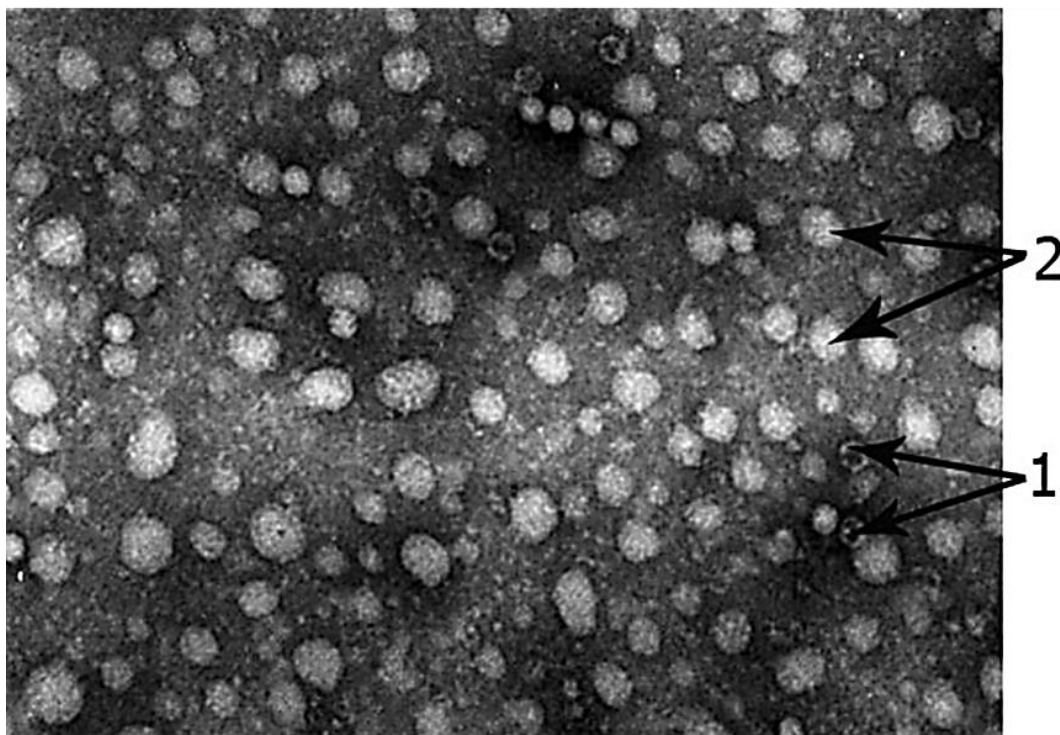


Рис. 5.4 Електронна мікрофотографія. 1 – клінічні ізоляти вірусів поліомієліту 1 типу після концентрування ПЕГ-6000; 2 – забруднюючі речовини. Контрастування 1% ФВК (рН 6,0). Збільшення 60 000×.

У літературі повідомляється про високу ефективність способу двофазного розділення [296]. Водночас нами показано, що зразки, отримані при застосуванні двофазного розділення, виявилися непридатними для проведення електронно-мікроскопічного дослідження у зв'язку із їх високою в'язкістю та неможливістю нанесення досліджуваного матеріалу на плівки-підложки.

Оптимальним, на наш погляд, методом концентрування ентеровірусів для проведення ЕМ є концентрування бентонітом, який дозволяє отримати не лише високі титри вірусів, але й в процесі концентрування очистити їх від неспецифічних забруднювачів (рис. 5.5). Крім цього, в результаті проведення серії повторних дослідів достовірно встановлено, що частота виявлення

віріонів на плівці-підложці після концентрування бентонітом була на 30-50% вищою, у порівнянні з іншими способами концентрування вірусомісного матеріалу.

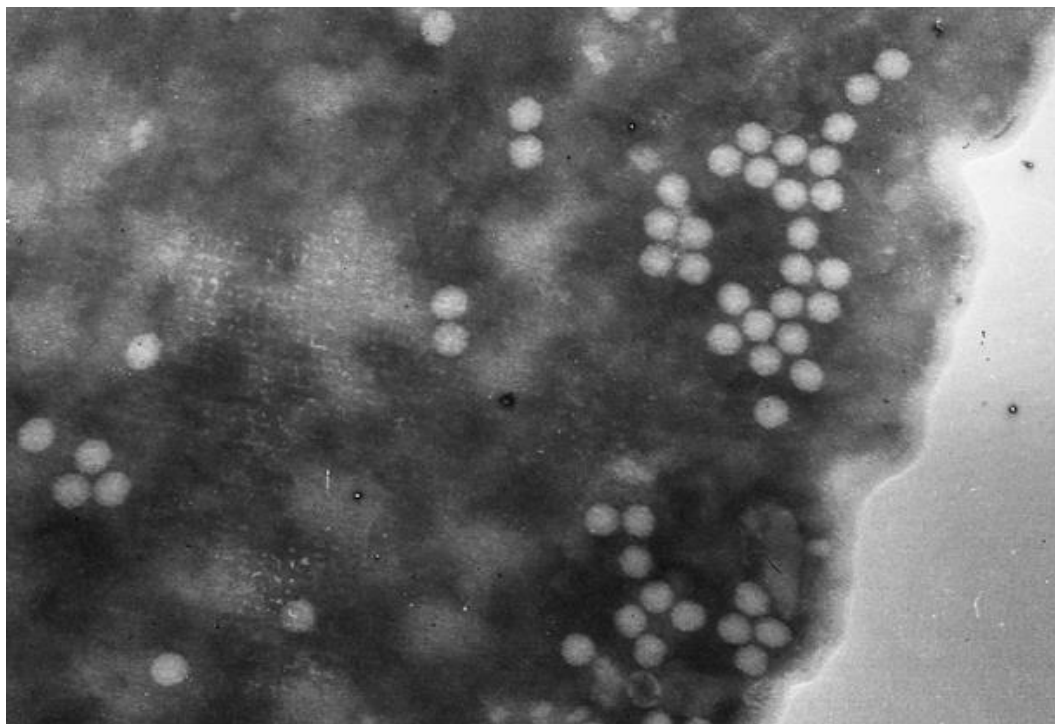


Рис. 5.5. Електронна мікрофотографія. Віруси поліомієліту 1 типу (клінічні ізоляти) після концентрування бентонітом. Очищені вірусні часточки від неспецифічних забруднювачів. Контрастування 1% ФВК (рН 6,0). Збільшення 60 000×.

Узагальнені порівняльні дані ефективності методів концентрування лабораторних штамів та клінічних ізолятів поліовірусів представлені в табл. 5.5.

Електронну мікроскопію в медичній практиці залучають рідко, хоча протягом тривалого часу дослідники демонструють ефективність даного методу для лабораторної діагностики деяких вірусних інфекції [309, 310]. На наш погляд, в першу чергу, обмеженість використання даного методу досліджень у лабораторній практиці пов'язана з низькою чутливістю даного методу. При проведенні електронно-мікроскопічних досліджень вірусів з

титром 10^5 - 10^6 ТЦД₅₀/мл, які знаходились в культуральному середовищі (199, ДМЕМ, Ігла), ми зіткнулись з низкою методичних труднощів: при невеликій концентрації вірусів їх електронно-мікроскопічна ідентифікація є складною, інколи навіть неможливою, а процес концентрування потребує не лише реактивів, вартісного обладнання, але і значних затрат часу. Це в значній мірі обмежує діагностичні можливості даного методу.

Таблиця 5.5

**Ефективність різних методів концентрування вірусів
з культуральної рідини**

Досліджуваній вірус	Методи концентрування				
	Вихідний титр	5 % гель бентоніт у	Ультрацентр ифугування	Двофазне розділення	ПЕГ- 6000
	Титр вірусу (ТЦД ₅₀ /мл)				
Лаб. штам поліовірусу (І тип LSc2ab)	5,0±0,12	6,75±0,1	7,25±0,14	6,75±0,12	6,5±0,13
Клінічний ізолят поліовірусу (І тип)	4,5±0,14	6, 25±0,1	7,0±0,14	6,5±0,13	6,5±0,12

Раніше в нашій лабораторії розроблено спосіб електронно-мікроскопічної індикації лабораторних штамів ентеровірусів в матеріалі з низькими титрами шляхом нанесення на поверхню плівок-підложок сорбенту бентоніту, який має виражені сорбційні властивості до ентеровірусів [252].

Використовуючи даний підхід, вдалось отримати препарати з достатньою кількістю ентеровірусів безпосередньо на плівці-підложці для візуального дослідження. На даному етапі досліджень важливо було адаптувати даний спосіб для використання з метою електронно-мікроскопічної верифікації клінічних ізолятів, зокрема виділених від осіб з дисбіотичними порушеннями.

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 є тривалим, тим нижча ймовірність ідентифікувати вірусні часточки (максимально до 3 діб). Крім цього, для попередження інактивації вірусів, підготовка зразків клінічного матеріалу для електронно-мікроскопічних досліджень повинна здійснюватися з використанням центрифугування при 12 000 об/хв у центрифугі з охолодженням +4°C протягом 60 хв. Встановлено також, що частота виявлення вірусів залежить від типу плівки-підложки, яка використовується при даній мікроскопії. Дослідження показали зростання частоти ідентифікації вірусів при використанні плівок-підложок, отриманих з колодію. У порівнянні з формваровими, вони виявились менш гідрофобними та більш міцними до променю електронів, що впливало на якість отриманих знімків.

Загалом ефективність ЕМ індикації ентеровірусів в клінічному матеріалі не висока: візуально за допомогою електронної мікроскопії вдалось ідентифікувати ентеровіруси лише в 6 зразках з 10 досліджених (рис. 5.6). В цих препаратах найчастіше визначили поодинокі розташування вірусних часточок, на відміну від вірусних часточок, які знаходились в зразках, що піддавали очищенню та концентруванню. Слід також відмітити, що в таких препаратах відмічали значну кількість неспецифічних забруднюючих речовин. Не дивлячись на дані недоліки, нами вперше показана можливість електронно-мікроскопічного дослідження клінічних ізолятів ентеровірусів з використанням плівок-підложок з сорбентом без використання попереднього концентрування вірусомісного матеріалу.

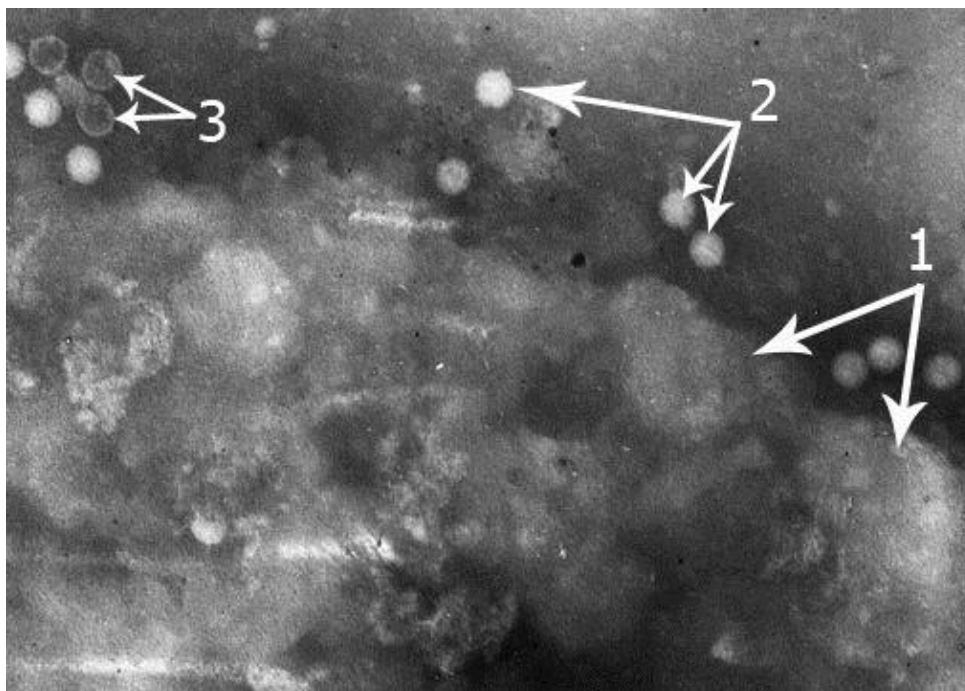


Рис. 5.6. Електронна мікрофотографія. Ентеровіруси в клінічному матеріалі. Контрастування 1% ФВК. 1 – часточки бентоніту; 2 – повноцінні вірусні часточки; 3 – «пусті форми віріонів». Збільшення 60 000×.

Дана методика показала свою ефективність не лише при індикації ентеровірусів, – використання плівок-підложек з бентонітом дозволило підвищити можливість електронно-мікроскопічної верифікації й інших мікроскопічних об'єктів, зокрема бактеріофагів (рис. 5.7).

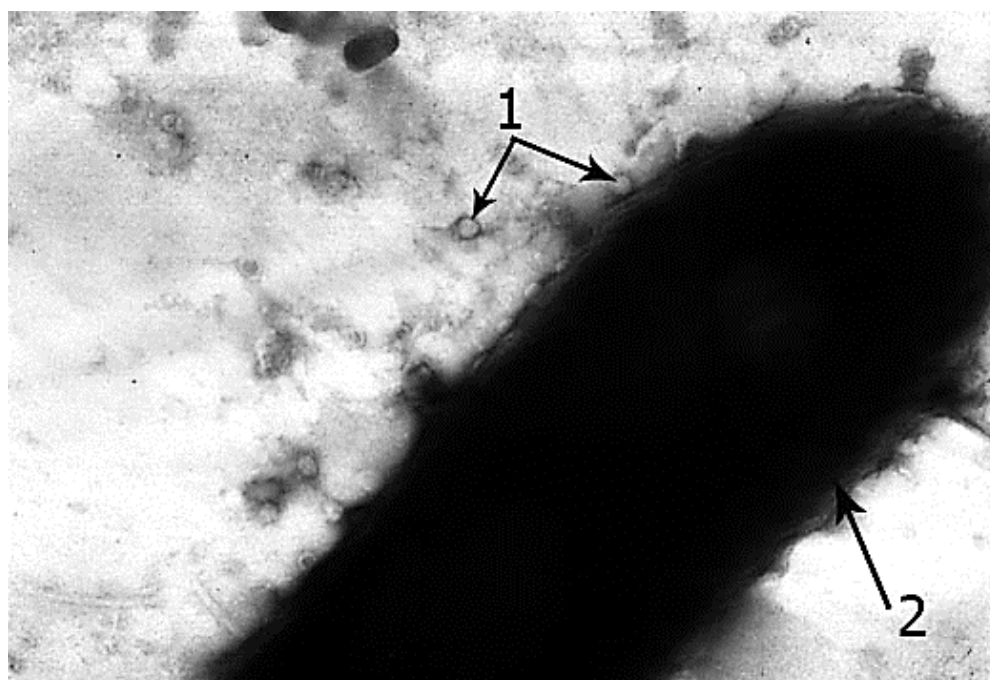


Рис. 5.7. Електронна мікрофотографія. 1 – MS₂ бактеріофаги; 2 – Кишкова паличка. Контрастування 1% ФВК. Збільшення 40 000×.

Такий підхід показав свою ефективність і при електронно-мікроскопічній діагностиці інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу, зокрема вірусом генітального герпесу (рис. 5.8) [311].

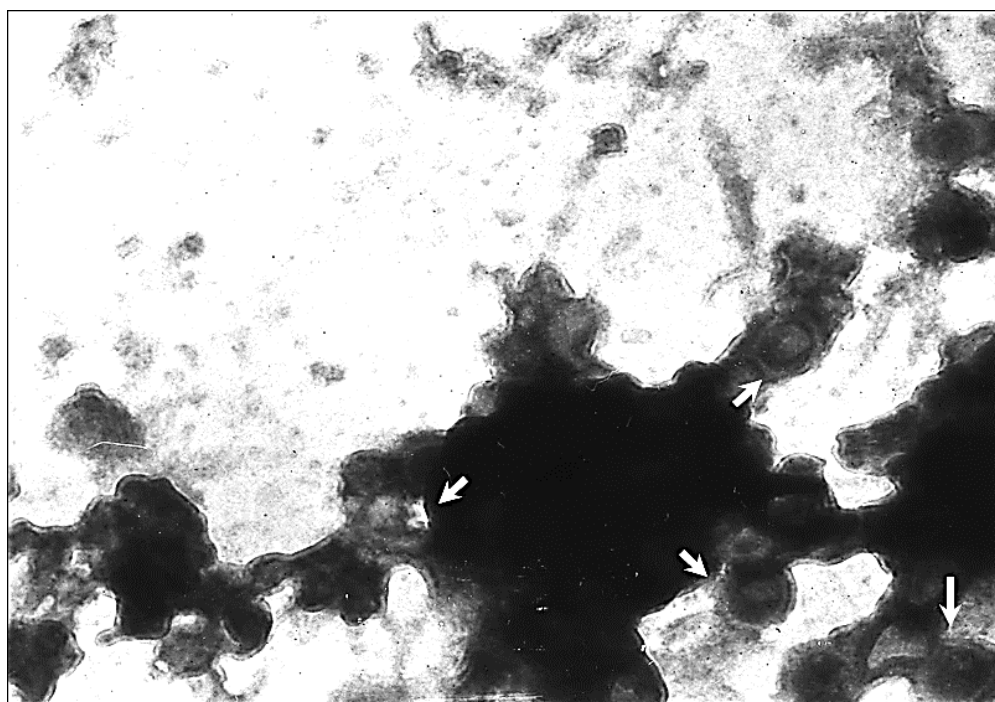


Рис. 5.8. Електронна мікрофотографія. Віруси герпесу на плівці-підложці з сорбентом бентонітом. Збільшення 40 000

Серед зразків, отриманих від 32 пацієнтів з підтвердженим в ПЛР генітальним герпесом, електронно-мікроскопічно з використанням плівок-підложок оброблених бентонітом, вірус було ідентифіковано у 21 зразку (65,62 %). Таким чином, результати наших досліджень засвідчили ефективність використання даного способу обробки плівок-підложок для підвищення чутливості електронно-мікроскопічної діагностики захворювань вірусної природи. Подальші дослідження також показали, що запропонований спосіб може бути використаний для оцінки ефективності лікування вірусних захворювань, зокрема герпетичної етіології [311].

5.3 Електронно-мікроскопічна верифікація клінічних ізолятів ентеровірусів від осіб з дисбіозом

Структурно-морфологічний та морфометричний аналіз електронограм показав, що виділені від осіб з дисбіозом віруси відповідають морфології ентеровірусів: розміри близько 30 нм, кубічний тип симетрії, є простими (рис. 5.9). Крім того, встановлено, що досліджувані вірусні агенти здатні найкраще контрастуватись 1-2% розчином ФВК з рН 6,0-6,5. Застосування даної контрастуючої речовини дозволило одержати якісне зображення не лише поверхні вірусних часточок, а і ідентифікувати вірусні капсомери та дослідити рівень їх електронної щільності. Водночас нами помічено зниження контрастності досліджуваних об'єктів і, відповідно, якості зображення, за умов використання ФВК з рН < 5,0 та > 7,5. Для усіх досліджених контрастерів визначено наступні недоліки: значна нерівномірність контрастування віріонів – в одному полі зору можна побачити як малоконтрастні, так і висококонтрастні віріони; втрата міцності плівки-підложки; значна зернистість зображення.

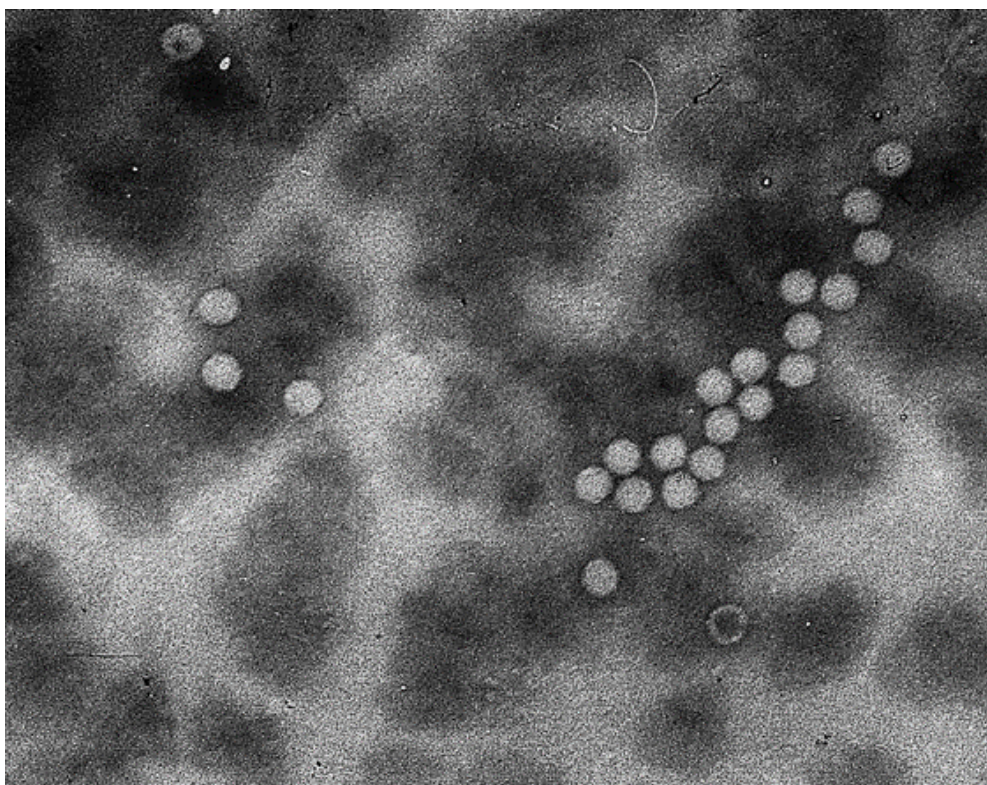


Рис. 5.9. Електронна мікрофотографія. Віруси Коксакі В, виділені від осіб з дисбіозом. Контрастування 1% ФВК. Збільшення 60 000 ×.

Проведеними на попередньому етапі дослідженнями, які були спрямовані на виявлення ентеровірусів, вдалося встановити, що деякі з досліджених зразків містили вірусні агенти, що були віднесені до групи нетипованих (див. Розділ 3). Виходячи з цього, наступним завданням було проведення електронно-мікроскопічних досліджень, спрямованих на встановлення морфології нетипованих вірусів та порівняння їх морфології з лабораторними штамми ентеровірусів (поліовірусу I типу LSc2ab).

Для культивування та накопичення нетипованих вірусних агентів використовували культури клітин HEp-2, усі роботи проводили у відповідності з рекомендаціями ВООЗ [244]. Отриманий матеріал концентрували з використанням бентоніту та вивчали у електронному мікроскопі. В результаті проведених експериментів вдалось у 7 з 11 досліджуваних зразків електронно-мікроскопічно зафіксувати вірусні агенти

(рис. 5.10). Візуальний та морфометричний аналіз показав, що за структурно-морфологічними особливостями ізольовані вірусні агенти відповідають морфології ентеровірусів: прості віруси, які не мають суперкапсидної оболонки, з кубічним типом симетрії та розмірами близько 30 нм, ефективно контрастуються 1% фосфорно-вольфрамовою кислотою, схильні до агрегації в препаратах, ефективно концентрувалися бентонітом [306]. В якості лабораторного еталонного зразку було використано музейний вакцинний штам поліовірусу I типу LSc2ab, який тривалий час пасажували в лабораторії вірусології кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О. Богомольця.

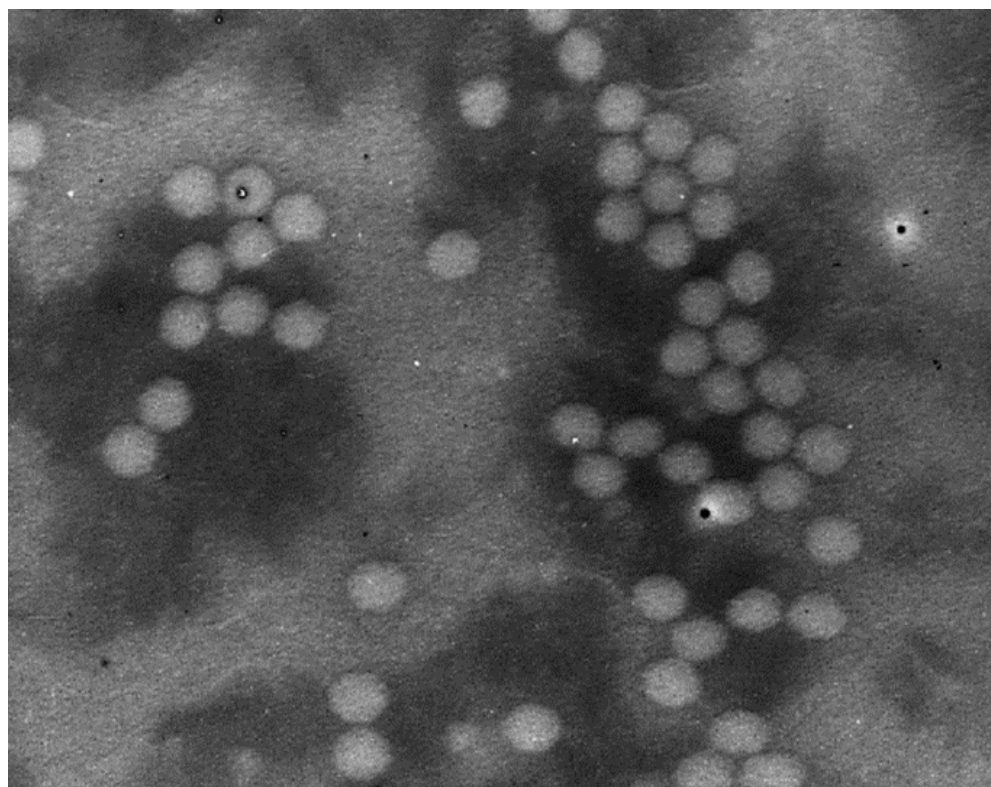


Рис. 5.10. Електронна мікрофотографія. Морфологія нетипованих вірусних агентів. Концентрування бентонітом. Контрастуюча речовина – 1% ФВК (рН 6,0). Збільшення 60 000×.

Після одержання фотознімків, подальший структурно-морфологічний аналіз нетипованих ентеровірусів проводили комп'ютеризовано, з використанням слайд-модулю, переводячи зображення з негативу у цифровий формат. Діаметр вірусів вимірювали за допомогою комп'ютерного аналізу, порівнюючи розміри віріонів із стандартними розмірами латексу, які становили 234 нм. В результаті проведення порівняльного аналізу електроннограм, було підтверджено однаковість розмірів досліджуваних вірусів (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Розміри віріонів нетипованих вірусних часточок

№ препарату	Розмір вірусних частинок (нм)
1	29±0,5
2	28,1±0,64
3	29,25±0,75
4	Не виявлено
5	29,4±0,88
6	Не виявлено
7	Не виявлено
8	29,6±0,5
9	Не виявлено
10	28,2±0,52
11	30±0,2

Електронно-мікроскопічні дослідження нетипованих ентеровірусів дали змогу встановити, що препарати містили до 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, що, очевидно, може бути

підтвердженням вищої резистентності клінічних ізолятів, у порівнянні з лабораторними штамми. В останніх при електронній мікроскопічній верифікації відсоток «пустих» вірусних часток сягав 30%.

Висновки до розділу 5.

Обґрунтовано доцільність використання комбінації декількох клітинних культур для швидкого виділення та ідентифікації ентеровірусів з фекальних мас, зокрема L20В, на яких добре культивуються віруси поліомієліту та НEr-2; які проявляють найвищу чутливість при виділенні інших видів ентеровірусів.

Порівняльними дослідженнями визначено оптимальні методичні підходи до концентрування ентеровірусів та підготовки препаратів для електронно-мікроскопічної верифікації, що дозволило більш ефективно вивчати структурно-морфологічні особливості вірусних агентів. Розроблено ефективний спосіб електронно-мікроскопічної верифікації вірусних часточок при дослідженні вірусомісного матеріалу з низьким титром

Використовуючи сучасні підходи до аналізу структурно-морфологічних особливості порівняльно вивчено 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.

За матеріалами розділу 5 опубліковано наступні праці:

1. 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.

2. Понятовський В. А., Широбоков В. П., Бобир В. В. Порівняльна чутливість перещеплюваних культур клітин до ентеровірусів виділених із стічних вод. Український науково-медичний молодіжний журнал. Спеціальний випуск №3. 2012. С. 11-14.

3. 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.

4. Понятовський В.А., Бобир В.В. Оптимізація концентрації ентеровірусів із стічних вод для генетичного аналізу // Український науково-медичний молодіжний журнал: тез. доп. V (66) Міжнародного науково-практичного конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини», жовтень 2012 р., м. Київ. – 2012. – Спеціальний випуск № 3. – С. 158.

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ДИСБІОТИЧНИХ ПОРУШЕНЬ НА РОЗВИТОК ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ У МИШЕЙ

Для більш ефективної корекції дисбіозу в кишківнику людей доцільно в експерименті на лабораторних тваринах виявити фактори і умови, що сприяють формуванню дисбіозу. Розробка адекватної моделі дисбіотичних порушень необхідна для вивчення характеру змін складу і властивостей кишкової мікрофлори у лабораторних тварин, а також для обґрунтування раціональних підходів з метою корекції мікроекологічних порушень. Це важливо з огляду на те, що отримані в експерименті на лабораторних тваринах результати можна в подальшому екстраполювати на організм людини як у плані профілактики, так і корекції дисбіотичних порушень.

6.1 Порівняльна оцінка способів моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин

З метою створення моделі дисбіотичних розладів на лабораторних тваринах використовують різні підходи, які детально описані у відповідному розділі. Сьогодні найчастіше дослідники пропонують спосіб моделювання дисбіозу кишківника у лабораторних тварин шляхом впливу антибактеріальних препаратів на кишкову мікрофлору та з подальшим визначенням кількості життєздатних мікроорганізмів кишкової мікрофлори на початку та наприкінці експерименту [238, 239, 241].

Модифікацій моделювання дисбіотичних станів у лабораторних тварин з використанням антибактеріальних препаратів є десятки. В основному методологічні особливості обмежуються вибором антибактеріального препарату. Найчастіше дослідники використовують такі препарати: гентаміцин, лінкоміцин, комбінації ампіциліну та лінкоміцину, комбінації

ампіциліну і метронідазолу, комбінації тетрацикліну та канамицину, а також комбінації ампіциліну, неоміцину, метронідазолу та ванкоміцину з їх пероральним механізмом введення лабораторним тваринам [238, 239, 241, 242].

Нами, в свою чергу, проведено порівняльне дослідження ефективності формування дисбіозу кишківника у мишей в залежності від обраної групи антибіотиків. Для цього було обрано наступні антибіотики та їх комбінації: гентаміцин (добова доза дорівнювала 2,9 мг), комбінація тетрацикліну і канамицину в дозі по 25мг/100 грам ваги; ампіцилін та метронідазол (добова доза кожного препарату дорівнювала 10 мг). Всього в експерименті було використано 80 тварин (по 20 в кожній з дослідних груп та контрольна). Тваринам перорально вводили антибактеріальні препарати за допомогою туберкулінового шприца з голкою з оливою на кінці.

Хід експерименту відбувався в наступному порядку: на початку досліду відбирали від мишей фекальні маси, зважували їх, після чого суспензували в 1,0 мл ізотонічного розчину хлориду натрію і висівали на щільні поживні середовища в чашках Петрі, які інкубували при температурі 37°C протягом 48 годин. Далі підраховували кількість колоній, що сформувались на поверхні поживного середовища. З урахуванням маси фекалій від кожної тварини і числа сформованих колоній робили перерахунок загального числа мікроорганізмів, біфідобактерій, лактобактерій і ешерихій на 1г фекалій. Через 24 години повторювали відбір фекалій для кількісного визначення мікрофлори і окремих її представників, повторно вводили перорально розчин антибіотику в вище зазначених дозах. Щодня, починаючи з другої доби, в кюветах з тваринами міняли підстилку для полегшення відбору свіжих фекальних мас. Відбір матеріалу та введення тваринам розчину антибіотиків повторювали протягом 5 діб, далі визначали загальну кількість фекальної мікрофлори та окремих її представників (ешерихій, біфідобактерій, лактобактерій).

Аналіз бактеріологічних показників ефективності моделювання дисбіозу у тварин, який представлений на рис. 6.1-6.3, свідчить про те, що

використання усіх взятих для експерименту антибактеріальних препаратів дає можливість отримати у мишей дисбіоз кишківника та опосередковано виявити у них мікроекологічні зміни фекальної мікрофлори [229, 240]. Разом з тим, за нашими даними, найбільш виражений дисбіоз формувався в результаті використання комбінації ампіциліну та метронідазолу: після їх п'ятиденного введення та через два дні після призупинення відмічали зниження загальної кількості мікроорганізмів до $1,8 \pm 0,4 \times 10^4$ КУО/г, зниження кількості *E.coli* до $1,2 \pm 0,8 \times 10^1$ КУО/г, зниження кількості *Bifidobacterium spp.* та *Lactobacillus spp.* до $3,2 \pm 0,6 \times 10^2$ КУО/г та $1,4 \pm 0,6 \times 10^2$ КУО/г відповідно. Результати мікробіологічних досліджень також показали можливість отримання позитивного результату і при використанні інших антибіотиків (тетрацикліну та канаміцину, гентаміцину), хоча глибина порушень мікробіоценозу за описаними показниками в останніх випадках була менш вираженою (рис. 6.1, 6.3).

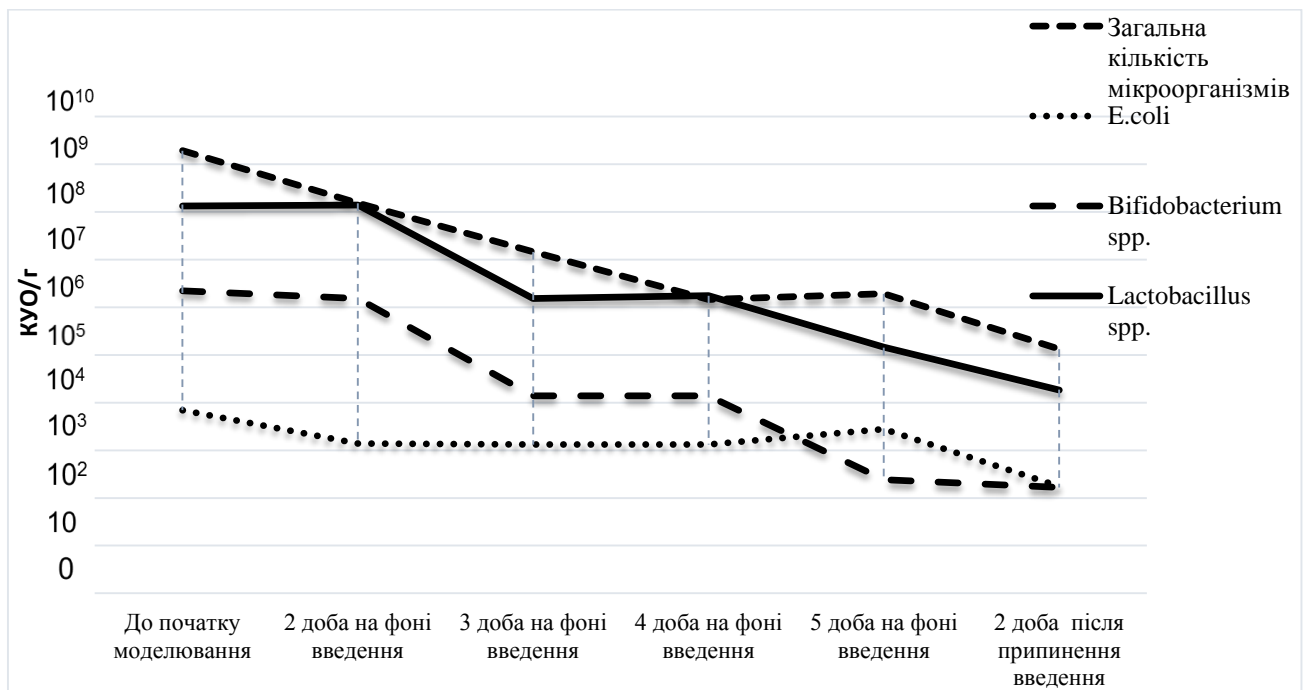


Рис. 6.1. Динаміка розвитку дисбіотичних порушень у мишей після введення комбінації тетрацикліну та канаміцину.

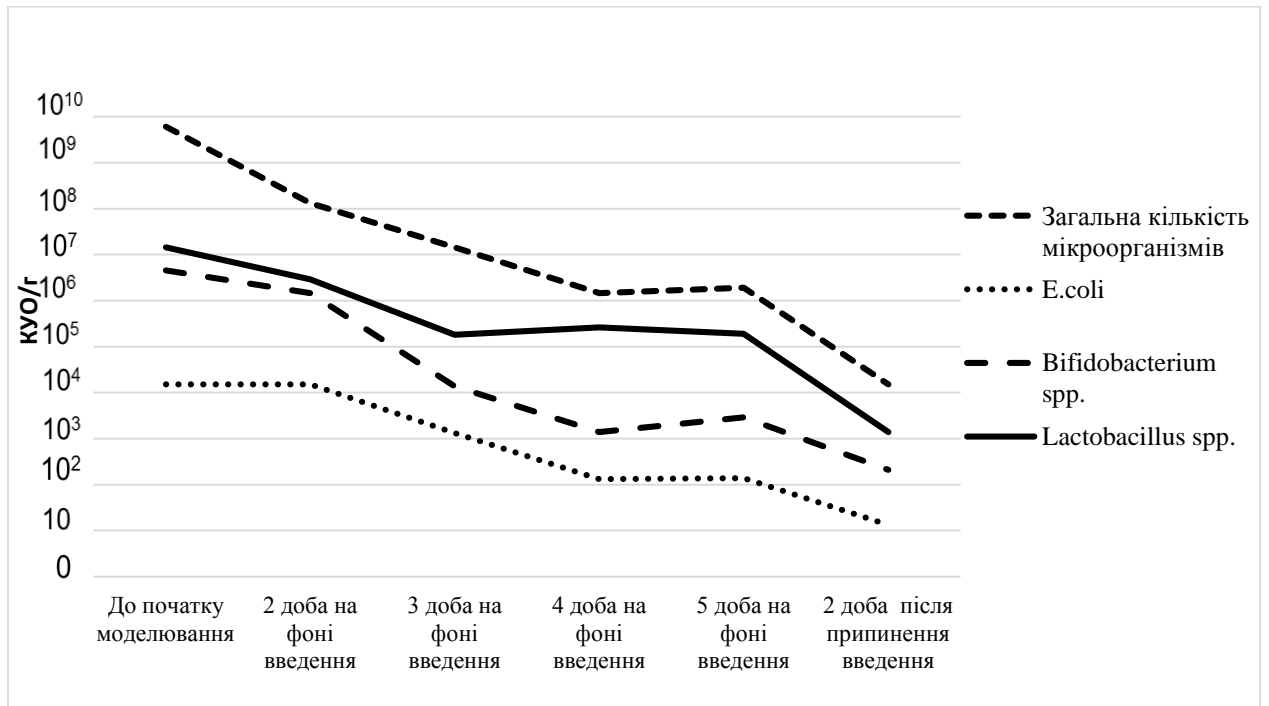


Рис. 6.2. Динаміка розвитку дисбіотичних порушень у мишей після введення комбінації ампіциліну та метронідазолу.

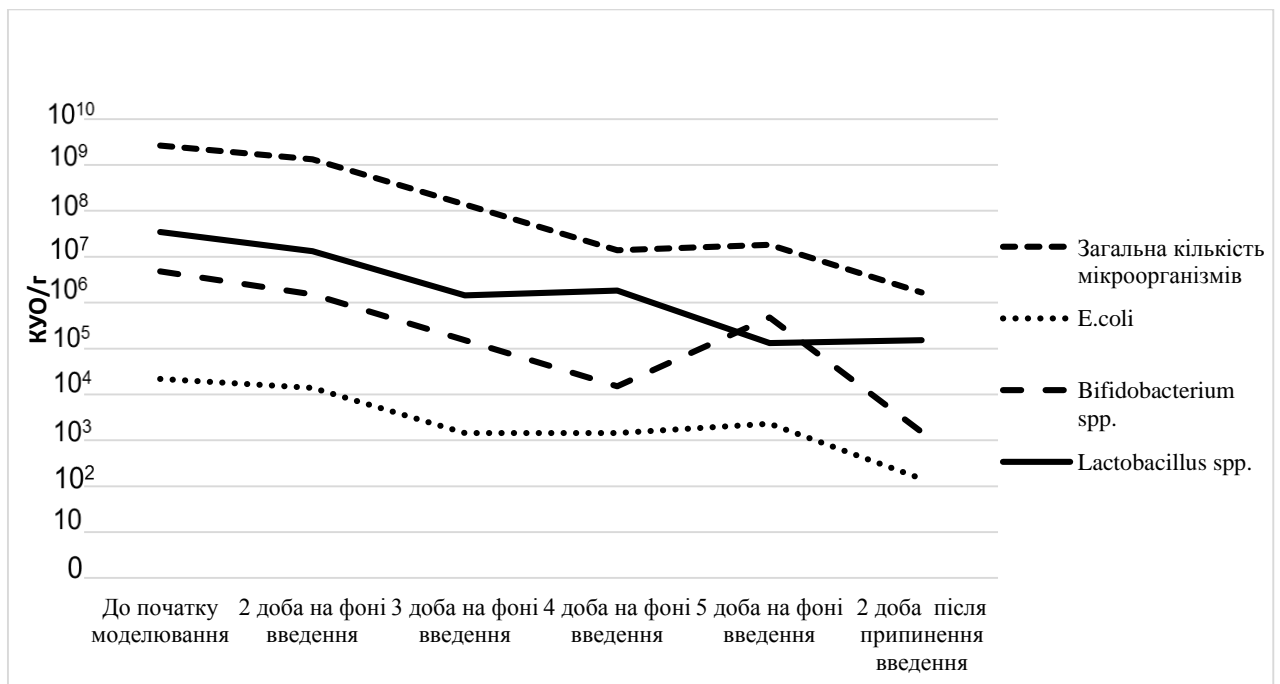


Рис. 6.3. Динаміка розвитку дисбіотичних порушень у мишей після введення гентаміцину.

Експерименти також засвідчили, що збільшення дози антибіотиків суттєво не впливало на глибину дисбіозу в кишківнику мишей. У кожній з дослідних груп різниця показників загального мікробного числа, кишкової

палички, біфідобактерій, лактобактерій протягом всього періоду експерименту статистично не відрізнялась від дослідної групи №2 ($P>0,05$) (табл. 6.1) [214].

Таблиця 6.1

Результати бактеріологічного дослідження фекалій мишей після пероральної інокуляції комбінації ампіциліну та метронідазолу (КУО/г)

Доба	Показники	Групи			
		I	II	III	Контроль
1	Загальне мікробне число	$1,1\pm 0,6\times 10^9$	$7,0\pm 0,6\times 10^8$	$5,8\pm 0,4\times 10^9$	$7,8\pm 0,4\times 10^9$
2	Кишкова паличка	$1,8\pm 0,6\times 10^6$	$1,4\pm 0,4\times 10^6$	$1,2\pm 0,6\times 10^6$	$1,8\pm 0,4\times 10^6$
	Біфідобактерії	$2,6\pm 0,4\times 10^6$	$1,2\pm 0,6\times 10^7$	$2,8\pm 0,5\times 10^6$	$3,1\pm 0,4\times 10^7$
	Лактобактерії	$1,8\pm 0,6\times 10^7$	$1,2\pm 0,6\times 10^7$	$2,2\pm 0,6\times 10^8$	$2,8\pm 0,4\times 10^8$
3	Загальне мікробне число	$1,2\pm 0,5\times 10^8$	$1,4\pm 0,4\times 10^8$	$1,6\pm 0,6\times 10^7$	$2,4\pm 0,5\times 10^9$
	Кишкова паличка	$1,5\pm 0,4\times 10^5$	$1,4\pm 0,6\times 10^5$	$1,4\pm 0,4\times 10^5$	$2,2\pm 0,5\times 10^5$
	Біфідобактерії	$3,1\pm 0,6\times 10^4$	$2,6\pm 0,4\times 10^4$	$2,2\pm 0,4\times 10^4$	$2,0\pm 0,4\times 10^8$
	Лактобактерії	$1,6\pm 0,4\times 10^6$	$3,8\pm 0,6\times 10^5$	$1,2\pm 0,6\times 10^6$	$1,4\pm 0,4\times 10^8$
4	Загальне мікробне число	$1,6\pm 0,4\times 10^6$	$1,8\pm 0,6\times 10^6$	$1,6\pm 0,7\times 10^6$	$8,2\pm 0,5\times 10^8$
	Кишкова паличка	$4,2\pm 0,6\times 10^3$	$2,4\pm 0,6\times 10^4$	$3,8\pm 0,2\times 10^3$	$2,4\pm 0,6\times 10^6$
	Біфідобактерії	$1,8\pm 0,4\times 10^3$	$1,2\pm 0,7\times 10^3$	$1,8\pm 0,7\times 10^3$	$2,8\pm 0,4\times 10^6$
	Лактобактерії	$1,2\pm 0,6\times 10^4$	$1,4\pm 0,4\times 10^4$	$2,0\pm 0,4\times 10^4$	$1,8\pm 0,4\times 10^8$
5	Заг. мікробне число	$8,2\pm 0,2\times 10^5$	$9,4\pm 0,7\times 10^5$	$1,1\pm 0,6\times 10^5$	$1,1\pm 0,6\times 10^9$
	Кишкова паличка	$3,8\pm 0,6\times 10^1$	$1,4\pm 0,4\times 10^2$	$3,0\pm 0,4\times 10^2$	$1,6\pm 0,4\times 10^6$
	Біфідобактерії	$2,4\pm 0,4\times 10^2$	$1,6\pm 0,6\times 10^2$	$1,2\pm 0,4\times 10^3$	$1,8\pm 0,6\times 10^6$
	Лактобактерії	$2,6\pm 0,7\times 10^4$	$2,0\pm 0,4\times 10^4$	$2,2\pm 0,4\times 10^4$	$2,6\pm 0,6\times 10^8$

Примітки: I – концентрація препаратів по 20 мг/тварину в день;
 II – концентрація препаратів по 10 мг/тварину в день;
 III – концентрація препаратів по 5 мг/тварину в день;
 К – тварини, які не отримували антибактеріальні препарати.

Натомість, збільшення дози антибактеріальних препаратів часто 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 ($P \leq 0,05$) (рис. 6.4). Не виключено, що зростання дози антибіотиків призводило до реалізації їх побічних властивостей, зокрема, токсичності, і, як результат – відбувалося зниження ваги тіла тварин. В досліді використано 80 тварин (кожна з дослідних груп тварин включала 20 особин та контрольна).

г

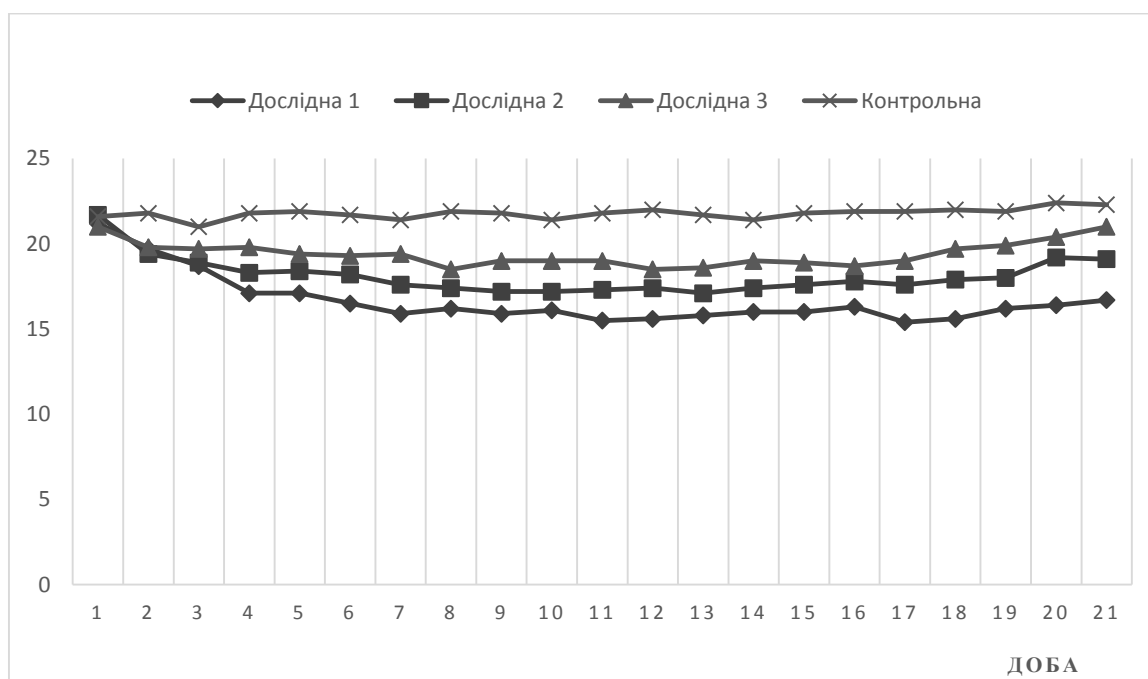


Рисунок 6.4. Динаміка зміни ваги тварин в процесі моделювання дисбіотичних станів з використанням ампіциліну та метронідазолу.

Примітки: Дослідна 1 – концентрація препаратів по 20 мг/тварину в день; дослідна 2 – концентрація препаратів по 10 мг/тварину в день; дослідна 3 – концентрація препаратів по 5 мг/тварину в день; контрольна.

Слід відмітити, що результати математичної обробки багаторічного дослідження чутливості мікроорганізмів до антибіотиків з подальшою

побудовою прогностичних моделей, дозволили виявити параболічний характер зміни чутливості мікроорганізмів до антимікробіних препаратів з тенденцією до її зниження, що, безперечно, слід враховувати в подальшому для моделювання дисбіотичних порушень у тварин [73].

Крім описаного вище способу моделювання дисбіозу з використанням антибактеріальних препаратів, випробувано можливість моделювання таких станів шляхом використання антисептиків. Питання моделювання дисбіозу у тварин з використанням антисептиків є принципово новим, оскільки лише останніми роками з'явилися наукові праці, в яких йдеться про ефективність використання в медичній практиці антисептиків кишкової дії. Такі препарати не всмоктуються в кишечнику, створюючи високу концентрацію безпосередньо у вогнищі інфекції та не мають системної дії [312, 313]. Слід зазначити, що у 2018 році в Україні презентована нова стратегія щодо реалізації державної політики з попередження формування стійкості бактерій до протимікробних препаратів на 2018–2022 рр., яка позиціонує наукові дослідження даного напрямку як пріоритетні [314].

Сучасний фармацевтичний ринок насичений десятками нових протимікробних препаратів, але для поставленої мети особливу цінність набувають антисептики з широким спектром антибактеріальної та антимікотичної дії, що розкриває можливості їх широкого застосування. Цим вимогам в значній мірі відповідають антисептичні лікарські засоби на основі декаметоксину, які дозволені МОЗ України для профілактики і лікування інфекційних захворювань [315]. Сьогодні доведено їх високі протимікробні властивості щодо музейних та клінічних штамів різних видів мікроорганізмів [316]. Нами встановлено, що деякі з них, зокрема декаметоксин, володіють вираженою протимікробною дією, оскільки мають високу поверхневу активність, миючу та емульгуючу властивості, а завдяки дифільній структурі, їх молекули здатні змінювати поверхневий натяг бактеріальних клітин, сприяючи порушенню осмотичної рівноваги, в наслідок чого відбувається «осмотичний шок» та загибель мікроорганізмів. Показано глибокі структурно-

морфологічні зміни грампозитивних (*S.aureus*) і грамнегативних (*A.baumannii*) мікроорганізмів, які формуються в результаті впливу дексаметоксину: поліморфізм клітин, пошкодження їх оболонки, втрату типової структури, відшарування клітинної стінки, пригнічення поділу клітин, появу лізису клітин [317].

Проведені дослідження токсичності антисептиків показали, що декаметоксин був нетоксичним для культури клітин RK13 в концентрації 7,75 мкг/мл, НЕР-2 – 5 мкг/мл, ККФ– 4 мкг/мл. Крім того, результати визначення його токсичності на тканинній культурі ХАО 11–14-добових курячих ембріонів показали дозволили встановити, що декаметоксин був нетоксичним у дозі меншій 30 мкг/мл. Такі дослідження доводять можливість його використання з метою моделювання дисбіотичних розладів [318]. Крім того, проведено порівняльну оцінку антимікробної активності основних антисептичних лікарських препаратів щодо полірезистентних клінічних штамів бактерій та *C. albicans*. Як видно з даних таблиці 6.2, штами *S. aureus* виявилися високочутливими до декаметоксину. Так, чутливість *S. aureus* до декасану проявлялася в присутності $4,31 \pm 0,48$ мкг/мл. Встановлено високі антимікробні властивості досліджуваних антисептиків до *Enterococcus spp.*, з перевагою декаметоксину. Бактерицидні властивості ДС перевищували протимікробну активність МР в 1,8 разів, ХГ та етонію – в 4,8 рази ($p < 0,001$). З високою достовірністю визначено суттєві переваги бактерицидної активності декасану (МБцК – $9,43 \pm 0,49$ мкг/мл) щодо ізолятів кишкової палички в порівнянні з іншими досліджуваними антисептичними засобами ($p < 0,001$). Встановлено, що клінічні штами *E. coli* були найменш чутливими до етонію (МБцК $64,75 \pm 4,72$ мкг/мл). Дослідження протимікробних властивостей антисептичних лікарських засобів показало найвищу ефективність декаметоксину щодо *Enterobacter spp.* (МБцК – $18,75 \pm 2,08$ мкг/мл; $24,21 \pm 2,96$ мкг/мл, відповідно). Вищі бактерицидні концентрації антисептиків встановлено щодо клінічних штамів *Proteus spp.* Найбільш чутливими протеї були до дії лікарських засобів ДС (МБцК – $84,38 \pm 5,98$ мкг/м)

та МР (МБцК – 90,63±5,04 мкг/мл). Бактерицидну дію ХГ на *Proteus spp.* визначали в присутності 156,25±17,12 мкг/мл. Антимікробна активність етонію щодо *Proteus spp.* була меншою за активність ДС в 2,9 разів ($p<0,001$) [318].

Таблиця 6.2

**Мінімальні бактерицидні/фунгіцидні концентрації лікарських засобів
для тест-штамів, мкг/мл (M ± m)**

Мікроорганізм (n)	декасан	мірамістин	хлоргексидину біглюконат	етоній
<i>S. aureus</i> (n 65)	4,31±0,48	10,50±1,02*	13,65±1,01*	17,94±6,63** *
<i>Enterococcus spp.</i> (n 23)	4,45±0,38	8,14±0,34*	21,37±1,91*	21,37±1,71*
<i>E. coli</i> (n 55)	9,43±0,49	17,51±1,01*	21,49±1,57*	64,75±4,72*
<i>Enterobacter spp.</i> (n 10)	18,75±2,08	24,21±2,96*	32,03±4,11**	53,13±4,77*
<i>Proteus spp.</i> (n 15)	84,38±5,98	90,63±5,04†	156,25±17,12*	241,67±37,53 *
<i>K. pneumoniae</i> (n 12)	20,83±1,78	24,08±2,63* **	42,32±5,48*	83,97±9,77*
<i>A. baumannii</i> (n 46)	31,79±2,19	58,7±2,83*	73,34±5,93*	120,24±9,01*
<i>P. aeruginosa</i> (n 35)	80±4,2	92,86±3,0** *	142,86±11,62*	410,71±23,24 *
<i>C. albicans</i> (n 20)	13,82±0,88	21,05±2,09* *	19,71±1,58**	20,52±2,19**

Примітка: * $p<0,001$ – порівняно з декасаном; ** $p<0,01$ – порівняно з декасаном; *** $p<0,05$ – порівняно з декасаном; † $p>0,05$ – порівняно з декасаном.

Також встановлено пряму кореляційну залежність між чутливістю ізолятів синьогнійної палички до декасану та їх здатністю утворювати біоплівки. Критерій r-Пірсона для даних показників складав 0,74 [319], тобто

чутливість *P. aeruginosa* до декасану має прямий кореляційний зв'язок з їх біоплівкоутворюючими властивостями. Тобто, чим вищою здатністю утворювати біоплівки володіє збудник, тим більші бактеріостатичні концентрації антисептика щодо нього потрібно застосувати.

Враховуючи вище представлені результати, для подальших досліджень обрано препарат декасан. Для моделювання дисбіотичних станів у тварин використано дві дози декасану: 0,01 мг та 0,02 мг. Кількість тварин, задіяних в експерименті становила 60 особин (по 20 в кожній з дослідних груп та контрольна). Методика формування дисбіотичних станів була наступною: за допомогою туберкулінового шприца з голкою з оливою на кінці тваринам перорально вводили ДКМ в об'ємі по 100 мкл на одну тварину на добу. Одночасно в поїлку з водою додавали зазначені антисептики в концентрації 0,02%. Через 24 години повторювали відбір фекалій для кількісного визначення мікрофлори і окремих її представників. Відбір матеріалу та введення тваринам розчину антисептиків повторювали протягом 5 діб, далі визначали загальну кількість фекальної мікрофлори та окремих її представників на 3, 5 добу та через 2 доби після припинення використання препарату.

В процесі моделювання дисбіотичних порушень з використанням декасану у контрольній групі тварин зафіксований нормальний мікробіологічний фон (загальна кількість мікроорганізмів – $3,2 \times 10^8$ КУО/г, *E. coli* $2,2 \times 10^4$ КУО/г, *Lactobacillus spp.* $1,4 \times 10^7$ КУО/г, *Bifidobacterium spp.* $1,8 \times 10^8$ КУО/г) (рис. 6.5-6.6).

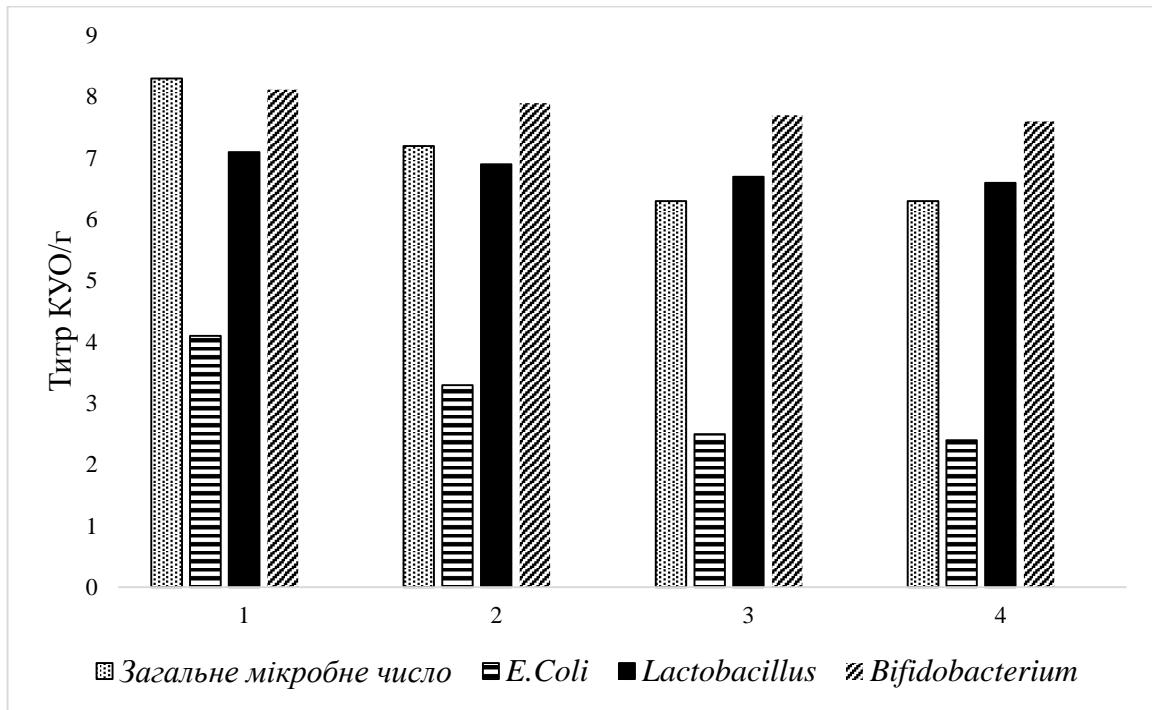


Рис. 6.5. Склад мікрофлори просвіту кишківника мишей в нормі (1) та після використання ДКМ в дозі 0,01 мг на 3 добу (2), 5 добу (3) та через 2 доби після припинення (4).

Разом з тим, як показано на рис. 6.5, використання ДКМ не формує виражених дисбіотичних порушень та мало впливає на основні мікробіологічні показники – маркери дисбіозу (загальну кількість мікроорганізмів, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *E. coli*). Збільшення концентрації ДКМ також не сприяє формуванню виражених дисбіотичних розладів – після 5-денного використання антисептиків у концентрації 0,02 мг зниження мікробіологічних показників було наступним: загальна кількість мікроорганізмів знизилась з $3,2 \times 10^8$ КУО/г до $1,4 \times 10^6$ КУО/г на 5 добу та до $2,8 \times 10^6$ КУО/г на 2 добу після припинення, *E. coli* – з $2,2 \times 10^4$ КУО/г до $3,5 \times 10^2$ КУО/г на 5 добу та до $4,2 \times 10^2$ КУО/г на 2 добу після припинення, *Lactobacillus spp.* – з $1,4 \times 10^7$ КУО/г до $6,4 \times 10^6$ КУО/г на 5 добу та до $1,3 \times 10^6$ КУО/г після припинення, *Bifidobacterium spp.* – з $1,8 \times 10^8$ КУО/г до $4,7 \times 10^7$ КУО/г на 5 добу та до $5,6 \times 10^7$ після припинення (рис. 6.6).

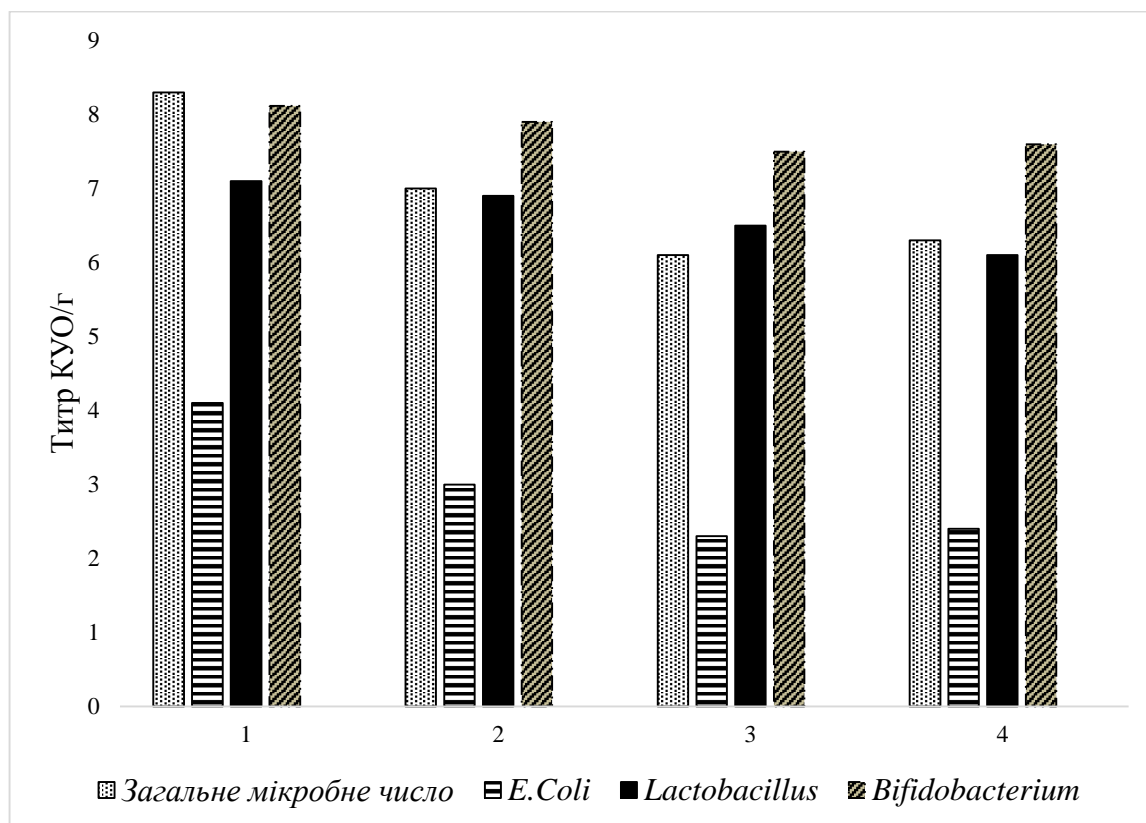


Рис. 6.6. Склад мікрофлори просвіту кишківника мишей в нормі (1) та після використання ДКМ в дозі 0,02 мг на 3 добу (2), 5 добу (3) та через 2 доби після припинення (4).

Важливим є й те що, не зважаючи на зниження загального мікробного числа та *E. coli*, показники *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.* після використання ДКМ змінились мало. Такі результати свідчать про перспективність використання антисептичних препаратів для лікування кишкових інфекцій з позиції збереження мікробіому.

Спираючись на наукові праці, в яких йдеться про можливість потенціювання ДКМ дії антибіотиків [378], проведено моделювання дисбіотичних порушень у мишей з використанням комбінації антибіотиків та антисептиків. Антибіотики (ампіцилін та метронідазол) тваринам вводили внутрішньошлунково в концентрації та способом описаними вище, антисептик ДКМ тварини отримували в поїлці в концентрації 0,02%. Для експерименту використано 40 тварин (20 дослідних та 20 контрольних).

За результатами досліджень встановлено, що присутність в поїлці ДКМ в концентрації 0,2 мг/мл сприяє формуванню дисбіотичних порушень у мишей, очевидно, за рахунок потенціювання дії використаних в експерименті антибіотиків (рис. 6.7) [379].

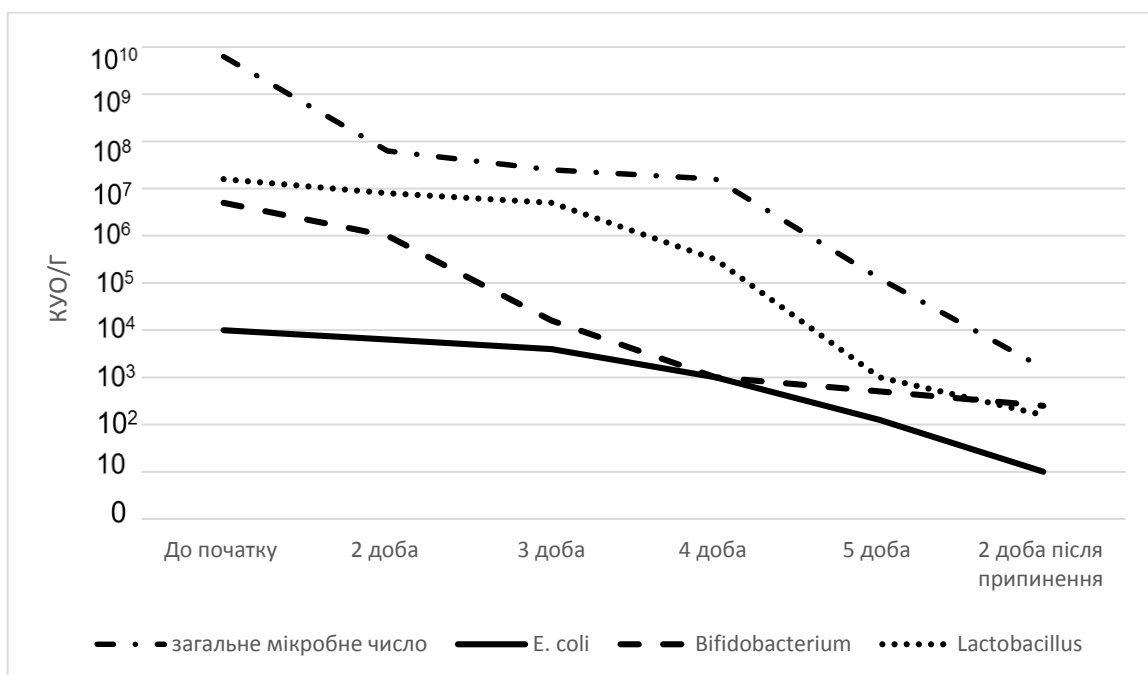


Рис. 6.7. Динаміка розвитку дисбіотичних порушень у мишей після моделювання комбінацією ампіциліну, метронідазолу та декамтоксину.

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 $1,0 \pm 0,4 \times 10^1$ 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 змінились мало. В цілому, отримані результати доводять перспективність використання досліджуваної комбінації препаратів для моделювання дисбіотичних станів.

6.2 Моделювання ентеровірусних інфекцій у мишей з дисбіозом

Подальші досліджень стосувались питання можливості моделювання ентеровірусних інфекцій у тварин з порушеним мікробіоценозом в кишківнику та з'ясування впливу дисбіотичних порушень на перебіг інфекції та динаміку виділення вірусу від тварин. Моделювання на лабораторних тваринах сьогодні дозволяє отримати максимально наближену до людського організму інформацію, яка стосується закономірностей патогенезу, клініки, імунної відповіді або інших компонентів комплексної реакції організму на збудника.

Моделювання ентеровірусних інфекцій на лабораторних тваринах має певні особливості, які пов'язані з їх специфічною чутливістю до окремих видів даних патогенів. Так, наприклад, для вірусів Коксакі В найбільш чутливими є так звані «миші-сисунці», віком до 3 діб, серед вірусів поліомієліту лише другий тип може викликати клінічні симптоми у мишей при парантеральному введенні, а до інших ентеровірусів миші взагалі є мало чутливими. Слід відмітити, що на сьогодні наукової інформації, присвяченої моделюванню ентеровірусної інфекції у тварин, недостатньо.

В роботі використано вакцинні штами поліовірусу 2 серотипу (робота виконувалась до введення в дію Наказу МОЗ України № 237 від 24.03.2016 року «Про деякі питання застосування вакцини для профілактики поліомієліту», який передбачає заборону використання вказаних серотипів в наукових дослідженнях) та віруси Коксакі В3. Експерименти проведені на 30-денних білих мишах лінії Balb/c, які пройшли попередню акліматизацію в умовах лабораторії. Першим етапом стало дослідження впливу дисбіотичних розладів на захворюваність та смертність мишей, інфікованих Коксакі В та поліовірусами. Для цього всі тварини були поділені на дві групи по 60 тварин в кожній. У першій групі провели формування антибіотикоіндукованого дисбіозу за вище описаною методикою [229], далі 30 тварин були інфіковані

вірусом поліомієліту, а 30 – вірусом Коксакі В3. Друга група (60 тварин) сформована мишами зі збереженою мікрофлорою, 30 з них були інфіковані поліовірусом та 30 – Коксакі В3. Контрольна група становила 10 тварин і залишилась інтактною. Термін спостереження за тваринами становив 21 добу. Порівняльну чутливість мишей до вірусів вивчали за такими показниками як смертність та наявність ознак захворювання (зниження активності, млявість, тремтіння, настовбурченість шерсті, діарея).

Результати, представлені в табл. 6.3, свідчать про відсутність статистично достовірної різниці захворюваності та смертності у групах мишей з дисбіотичними розладами та зі збереженою мікрофлорою, які були інфіковані вірусом 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 ($P>0,05$).

Таблиця 6.3

Вплив дисбіотичних порушень на чутливість мишей до ентеровірусів

Прояв	Вірус			
	Коксакі В3		Поліовіруси 2 типу (вакц)	
	Дисбіоз – (n=30)	Дисбіоз + (n=30)	Дисбіоз – (n=30)	Дисбіоз + (n=30)
Смерть	16,66% (n=5)	20 % (n=6)	0% (n=0)	0% (n=0)
Ознаки хвороби	23,33% (n=7)	26,67% (n=8)	13,33 (n=4)	16,67 (n=5)
Без змін	60,0% (n=18)	53,33% (n=16)	86,7% (n=26)	83,3% (n=25)

Слід відмітити, що тварини як з дисбіозом, так і зі збереженою мікрофлорою виявились мало чутливими до вірусів поліомієліту 2 типу: смертність серед мишей обох груп не спостерігалась взагалі, а ознаки хвороби відмічались в межах 13-16% в обох груп і були статистично не достовірними ($P>0,05$).

6.3 Дослідження впливу бактеріальної мікрофлори на тривалість виділення ентеровірусів мишами

Кишкова мікрофлора наділена низкою важливих функцій для забезпечення нормального функціонування макроорганізму, зокрема, вона має виражену антагоністичну дію на патогенні представники мікробних популяцій, обмежуючи їхню колонізацію [67, 192]. Разом з тим, вплив бактерій, зокрема представників нормальної мікрофлори, на кишкові віруси в значній мірі залишається не вивченим [159, 320, 321]. Останніми роками дослідженню вірусно-бактеріальних взаємодій взагалі приділяється пильна увага, і не виключено, що новітні наукові дані можуть змінити уявлення про роль мікробіоти в патогенезі захворювань вірусної етіології.

В якості моделі для дослідженню впливу бактеріальної мікрофлори в складі пробіотичних препаратів на тривалість виділення ентеровірусів обрано білих мишей. В роботі використовувались тварини з сформованим дисбіозом (перша група) та без дисбіотичних порушень (друга група). Перша група тварин одночасно з початком моделювання дисбіотичних станів і потім протягом усього періоду моделювання (6 днів) отримувала перорально пробіотичні препарати, після чого на шосту добу була інфікована поліовірусами 2 типу. Друга група (тварини без дисбіозу) отримували перорально пробіотики одноразово разом з вказаними вірусами. На кожен вид живих мікроорганізмів та на кожен ліофілізований пробіотичний препарат брали по 10 тварин.

В експерименті використовувались пробіотичні мікроорганізми, що знаходились як у живому стані, так і ліофілізовані форми. Серед «живих» представників нормальної мікрофлори для досліду обрано наступні види мікроорганізмів: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Esherichia coli*, *Bacillus clausii* а також комбіновані форми, зокрема, мультипробіотик на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, «молочних» видів роду

Propionibacterium та оцтовокислих бактерій роду *Acetobacter*. Видовий склад мікроорганізмів мультипробіотичного препарату представлено в табл. 6.4.

Таблиця 6.4

Порівняльна таблиця моно- та мультипробіотичних препаратів

Монопробіотичні мікроорганізми, титр (КУО/мл)	Мікроорганізми в складі мультипробіотика титр (КУО/мл)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 10 ⁹ КУО/мл	-біфідобактерії – 1,0 × 10 ⁹ ;
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 10 ⁷ КУО/мл	- лактококи – 1,0 × 10 ⁹ ;
<i>Escherichia coli</i> M ₁₇ 10 ⁸ КУО/мл	- лактобацили – 1,0 × 10 ⁸ ;
<i>B. clausii</i> 10 ⁵ КУО/мл	- пропіоновокислі бактерії – 1,0 × 10 ⁸ ;
<i>B. subtilis</i> 10 ⁹ КУО/мл	- оцтовокислі бактерії – 1,0 × 10 ⁶ .

Ліофілізовані штами представників нормальної мікрофлори кишківника містили *Bacillus subtilis* УКМ В-5020 (не менше 10⁹ живих мікробних клітин); *L. plantarum* або *L. fermentum*, ліофільно висушених), *Bifidobacterium bifidum* (містить мікробну масу живих біфідобактерій штамів ліофільно висушених), *Escherichia coli* (ліофільно висушена маса живих бактерій *Escherichia coli* M17 (O2:K1:H6). Усі ліофілізовані пробіотики готували відповідно до інструкцій, запропонованої виробниками. І живі, і ліофілізовані форми вводили тваринам в об'ємі 50 мкл перорально за допомогою зонду, який дозволяє доставляти розчин безпосередньо в шлунок, щодня протягом всього періоду експерименту. Виділення вірусу мишами контролювали протягом 14 діб шляхом проведення постановки реакції титрування з використанням культури клітин НЕР-2 на 2, 5, 8, 11 і 14 добу після інокуляції.

Отримані експериментальні дані, представлені в табл. 6.5, показали здатність живих монопробіотичних препаратів на основі *L. plantarum*, *L. fermentum*, *B. bifidum*, *E. coli*, а також мультипробіотичних на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter*. скорочувати тривалість виділення вірусів поліомієліту у тварин без порушень

мікробіоценозу кишківника з 14 до 8 діб. Разом з тим, встановлено, що отримання тваринами з дисбіозом згаданих видів живих мікроорганізмів не впливає на динаміку звільнення їх організму від ентеровірусів: віруси в обох випадках виділялись протягом восьми діб, а їх титр коливався в межах від 1,0 до 1,5 $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл. Слід відмітити, що після отримання тваринами з дисбіозом таких спороутворюючих мікроорганізмів як *Bacillus clausii* відмічалась тенденція до зростання тривалості виділення досліджуваних вірусів з 8 до 14 діб, у порівнянні з контролем (К2) ($P>0,05$). У тварин зі збереженою мікрофлорою динаміка звільнення організму від вірусу на фоні вживання *B. clausii* не відрізнялась від контролю (К1).

Таблиця 6.5

Вплив живих пробіотичних мікроорганізмів на тривалість виділення та титр вірусів поліомієліту у фекальних масах

До ба	К1	К2	Мульти пробіотик	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. clausii</i>
2	3,25±0,5	2,75±0,11	3,25±0,12	3,5±0,3	3,25±0,34	3,0±0,18	3,25±0,2
5	3,0±0,14	2,5±0,17	2,0±0,15	3,0±0,19	2,5±0,18	2,0±0,19	3,0±0,2
8	3,0±0,14	1,0±0,11	1,25±0,12	1,5±0,14	1,25±0,16	1,0±0,17	2,0±0,15
11	1,25±0,08	-	-	-	-	-	0,75±0,16
14	0,5±0,03	-	-	-	-	-	0,5±0,14

Примітки: К1 – здорові тварини, інфіковані ВП2; К2 – тварини з дисбіозом, інфіковані ВП2. Титр виражений в $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл.

Після використання таких пробіотичних мікроорганізмів, як *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium 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, в порівнянні з контролем (К1). Так, інфіковані вірусом поліомієліту 2 типу здорові тварини виділяли збудник 14

діб, натомість після отримання пробіотичних штамів *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli* тривалість виділення ентеровірусів становила 11 діб, а після використання пробіотиків на основі *Lactobacillus* - 8 діб (табл. 6.6).

Таблиця 6.6

Вплив ліофілізованих пробіотичних мікроорганізмів на тривалість виділення та титр вірусів поліомієліту

Доба	K1	K2	<i>B. subtilis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. coli</i>
2	3,25±0,5	2,75±0,11	3,5±0,15	3,0±0,15	2,75±0,18	2,5±0,14
5	3,0±0,14	2,5±0,17	2,25±0,16	2,0±0,14	2,0±0,16	2,0±0,12
8	3,0±0,14	1,0±0,04	1,25±0,07	1,0±0,03	1,25±0,06	1,0±0,05
11	1,25±0,08	-	1,0±0,04	-	-	0,5±0,03
14	0,5±0,03	-	-	-	-	-

Примітки: K1 – здорові тварини, інфіковані вірусом поліомієліту 2 типу; K2 – тварини з дисбіозом, інфіковані вірусом поліомієліту 2 типу. Титр виражений в $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл.

Разом з тим, як показано в табл. 6.6, використання у ліофілізованому вигляді *B. subtilis* та *E. coli* у тварин з дисбіотичними порушеннями призводить в обох випадках до подовження періоду виділення ентеровірусів тваринами з 8 до 11 діб. Одержані дані не можна вважати достовірними ($P > 0,05$). Вживання ліофілізованих препаратів на основі *L. acidophilus* та *B. bifidum* не впливло на тривалість виділення вірусу поліомієліту у тварин з вираженим дисбіозом у порівнянні з тими тваринами, які отримували лише антибіотики (контрольна група №2). В обох випадках тривалість виділення вірусу становила 8 діб.

Динаміка зниження інфекційних титрів ентеровірусів у фекальних масах тварин, які отримували вище вказані пробіотичні препарати (живі та ліофілізовані), на другу і п'яту добу не відрізнялась від контрольної групи: інфекційний титр вірусу становив $3,0 \pm 0,15 -\log$ ТЦД₅₀/100 мкл та $2,5 \pm 0,1 -\log$ ТЦД₅₀/100 мкл, відповідно ($P > 0,05$). На 8 добу дослідження титр вірусів у

фекаліях тварин, які вживали живі пробіотичні мікроорганізми, знижувався на 1-2 порядки в порівнянні з контролем ($P \leq 0,05$). Найбільш суттєва різниця відмічалась у тварин, які отримували *E. coli*. В дослідних зразках фекалій тварин титр вірусів становив $1,0 \pm 0,17$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл, натомість у тварин контрольної групи – К1 (тварини без порушень мікробіоценозу, інфіковані ВП2), він дорівнював $3,0 \pm 0,14$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл ($P \leq 0,05$).

У фекаліях тварин, які вживали ліофілізовані препарати, найбільше виражене зниження титру на 8 добу відмічалось у групах мишей, які отримували *L. acidophilus* та *E. coli*. За таких умов титр вірусів зменшувався на два порядки у порівнянні з контролем ($P \leq 0,05$).

6.4 Вплив кишкової мікрофлори на збереження інфекційності ентеровірусів в експерименті

Не викликає сумніву той факт, що нормальна мікрофлора справляє позитивну дію на фізіологічні показники організму людини. Разом з тим, залишається не дослідженим питання взаємодії мікроорганізмів бактеріальної природи та вірусів. Це особливо важливо через те, що вірусно-бактеріальних асоціації часто є причиною захворюваності та смертності людей у всьому світі [179]. Не виключено, що вплив кишкового мікробіому на патогенез вірусних інфекцій, зокрема на реплікацію поліовірусу, може залежати від властивостей як мікробіоти, так і від властивостей самого вірусу.

Подальші дослідження стосувались впливу представників нормальної мікрофлори на тривалість збереження інфекційності вірусів в умовах *in vivo*. В експериментах використовувались білі миші лінії *BALB/c* (всього 80 тварин – по 40 в кожній групі). Схема експерименту: тваринам з антибіотикоіндукованим дисбіозом (дослідна група) та тваринам зі збереженою мікрофлорою (контрольна група) перорально вводили вакцинний поліовірус першого типу (штам Lsc2ab) в титрі $5,5$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл, об'ємом 100 мкл. Враховуючи час, необхідний для потрапляння введеного

матеріалу з шлунку в кишківник, через дві та через чотири години після інфікування мишей виводили з експерименту, забирали у них вміст нижніх відділів тонкого кишківника та вміст товстого кишківника і проводили виділення вірусів з використанням культур клітин HEp-2, HeLa, L20B відповідно до методики, рекомендованої ВООЗ [244].

За результатами виділення вірусів у трьох вказаних вище лініях клітинних культур, враховано середній титр вірусів, ізольованих із тонкого кишківника мишей з дисбіозом через дві години після інфікування поліовірусами, він становив $1,42 \pm 0,12 -\log \text{ТЦД}_{50}/100$ мкл, натомість середній титр вірусів, виділених із тонкого кишківника мишей зі збереженою нормальною мікрофлорою дорівнював $2,75 \pm 0,14 -\log \text{ТЦД}_{50}/100$ мкл ($P \leq 0,05$) (табл. 6.7). Слід відмітити, що порівняльна чутливість досліджених культур клітин (HEp-2, HeLa та L20B) до вірусів поліомієліту була приблизно однаковою, що свідчить про можливість використання будь якого типу з перелічених клітин для подібних досліджень [322]. Після чотирьох годин інфікування концентрація вірусів в тонкому кишківнику тварин усіх досліджуваних груп знижувалась не суттєво. Середній титр вірусів, виділених з тонкого кишківника мишей з дисбіозом після 4 год інфікування, становив $1,25 \pm 0,12 -\log \text{ТЦД}_{50}/100$ мкл, разом з тим у контрольної групи він дорівнював $1,83 \pm 0,1 -\log \text{ТЦД}_{50}/100$ мкл ($P \leq 0,05$).

Отримані дані свідчать про зниження концентрації вірусів у вмісті тонкого кишківника тварин з вираженими дисбіотичними порушеннями. Особливо чітко це спостерігається після 2 год інфікування, в цей час різниця титрів складає більше одного порядку. 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 години після інфікування при титруванні на різних культурах клітин, становив $1,17 \pm 0,1 -\log \text{ТЦД}_{50}/100$ мкл, натомість за даних умов середній титр вірусів, виділених з товстого кишківника мишей із збереженою нормальною мікрофлорою, дорівнював $1,83 \pm 0,12 -\log$

ТЦД₅₀/100мкл ($P \leq 0,05$). Після 4 год інфікування, дані показники дорівнювали $1,25 \pm 0,12$ $-\log$ ТЦД₅₀/100мкл та $2,17 \pm 0,1$ $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл відповідно ($P \leq 0,05$).

Таблиця 6.7

Інфекційні титри вірусів поліомієліту, виділених з кишківника мишей ($-\log$ ТЦД₅₀/100мкл)

		Культури клітин					
		HEp-2		HeLa		L20B	
		ТК	ТСК	ТК	ТСК	ТК	ТСК
I	Через 2 год	$2,5 \pm 0,14$	$1,0 \pm 0,4$	$2,75 \pm 0,14$	$2,25 \pm 0,28$	$3,0 \pm 0,2$	$2,25 \pm 0,13$
	Через 4 год	$1,75 \pm 0,21$	$2,0 \pm 0,13$	$1,75 \pm 0,14$	$2,25 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,13$	$2,25 \pm 0,24$
II	Через 2 год	$1,5 \pm 0,29$	$1,5 \pm 0,4$	$1,25 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0,21$	$1,5 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,21$
	Через 4 год	$1,0 \pm 0,14$	$1,5 \pm 0,3$	$1,25 \pm 0,12$	$1,0 \pm 0,23$	$1,5 \pm 0,28$	$1,25 \pm 0,29$

Примітки: I - Миші зі збереженою мікрофлорою; II - Миші з дисбіозом; ТК – тонкий кишківник; ТСК – товстий кишківник.

Для з'ясування впливу бактеріального компонента мікробіому на віруси використано також *in vitro* аналіз динаміки зниження інфекційності ентеровірусів, запропонований дослідниками з Техаського університету [14]. Відповідно до цього способу, фекалії мишей з дисбіозом (дослідна група) та мишей контрольної групи інфікованих поліовірусом, гомогенізували, розводили в середовищі 199, витримували при температурі 37° та 40°С,

фільтрували та титрували класичним мікрометодом [244]. Вихідний титр вірусу становив $5,5 -\log \text{ТЦД}_{50}/100\text{мкл}$.

Результати експерименту свідчать про те, що тривалість збереження інфекційної активності ентеровірусів у фекальних масах тварин з непорушеною мікрофлорою (контрольна група) і тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом (дослідна група) статистично не відрізняються як за температури $+37^{\circ}\text{C}$, так і за $+40^{\circ}\text{C}$. Разом з тим, аналіз динаміки зниження інфекційної активності поліовірусів у досліджуваних зразках показав зростання інтенсивності інактивації ентеровірусів у дослідній групі. Так, на 48 годину зберігання при температурі 37°C титр вірусів у фекальних масах тварин зі збереженою мікрофлорою становив $1,0 \pm 0,24 -\log \text{ТЦД}_{50}/100 \text{ мкл}$, натомість у фекаліях тварин з дисбіотичними порушеннями він дорівнював $0,25 \pm 0,14 -\log \text{ТЦД}_{50}/100\text{мкл}$ ($P < 0,01$) (рис. 6.9).

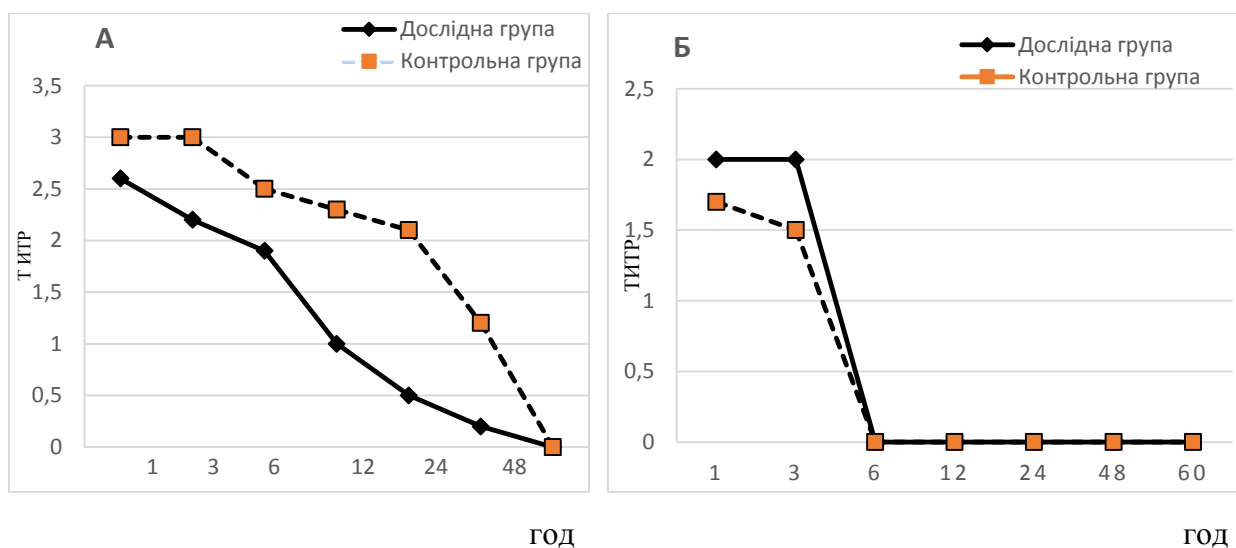


Рис. 6.9. Вплив дисбіотичних порушень на тривалість збереження вірусів поліомієліту у фекальних масах мишей (год).

Примітки: А – при зберіганні 37°C ; Б – при зберіганні 40°C . Титр виражений в $-\log \text{ТЦД}_{50}/100 \text{ мкл}$.

Для вивчення впливу мікроорганізмів бактеріальної природи на тривалість збереження інфекційності ентеровірусів при різних температурних

режимах в умовах *in vitro* використовувались як живі мікроорганізми: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (УКМ В-5020), *Lactobacillus plantarum* (8P-A3), *Bifidobacterium bifidum* (№ 791), так і інактивовані форми. Інактивацію здійснювали шляхом автоклавування при 1 атм протягом 45 хв. Концентрація бактеріальних клітин у вірусомісних зразках складала 10^8 КУО/мл, її визначали за допомогою оптичного стандарту мутності (ОСО – 42-28085 на 10 ОД), виробництва ДІСК імені Л.А. Тарасевича).

При спільному зберіганні вірусу поліомієліту 1 типу (штам Lsc2ab) з вище зазначеними мікроорганізмами у поживному середовищі при температурних режимах $+4^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$ та $+37^{\circ}\text{C}$. На 3, 10, 18, 36, 60 та 90 добу здійснювали контрольне титрування вірусу. Для цього вірусно-бактеріальну суміш фільтрували і одержаним фільтратом інфікували культури клітин. Контролем слугували зразки вірусів, які знаходилися в аналогічних умовах, без присутності мікроорганізмів бактеріальної природи.

Результати експериментів свідчать про зростання тривалості виживання ентеровірусів за умов присутності в середовищі деяких видів мікроорганізмів бактеріальної природи. Найбільш виражена різниця інфекційного титру вірусів відмічається при температурі $+20^{\circ}\text{C}$. За таких умов, присутність у вірусомісному матеріалі більшості досліджуваних штамів бактеріальних клітин сприяє зростанню титрів інфекційної активності ентеровірусів, а наявність *Bacillus subtilis*, сприяє також і зростанню тривалості виживання вірусних агентів: присутність даних мікроорганізмів подовжує термін виживання вакцинних штамів поліовірусів до 90 діб, в той час як у контролі на цей час спостереження інфекційного вірусу не зафіксовано. Після спільного зберігання вірусів та бактерій (живих і інактивованих) при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ зростання тривалості збереження ентеровірусів як у присутності живих, так і інактивованих мікроорганізмів не відмічалось (рис. 6.10 – 6.13) [382].

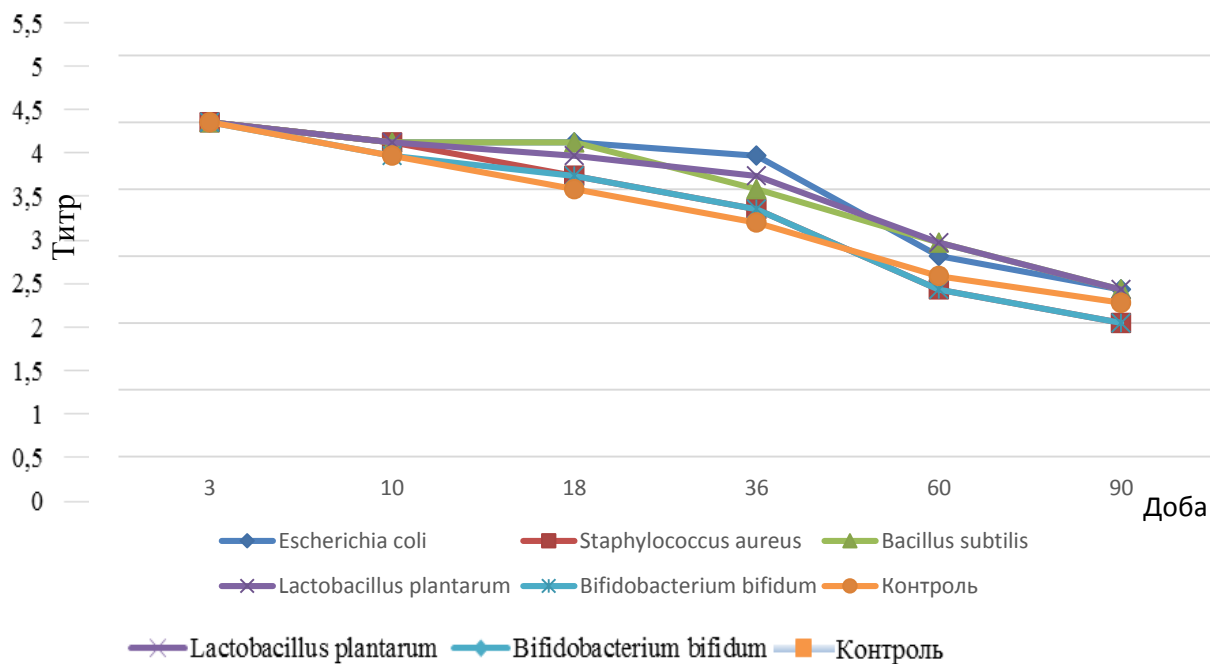


Рис. 6.10. Титр ентеровірусів після спільного зберігання з різними видами живих мікроорганізмів при температурі +4°C.

Примітка: титр виражений в $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл

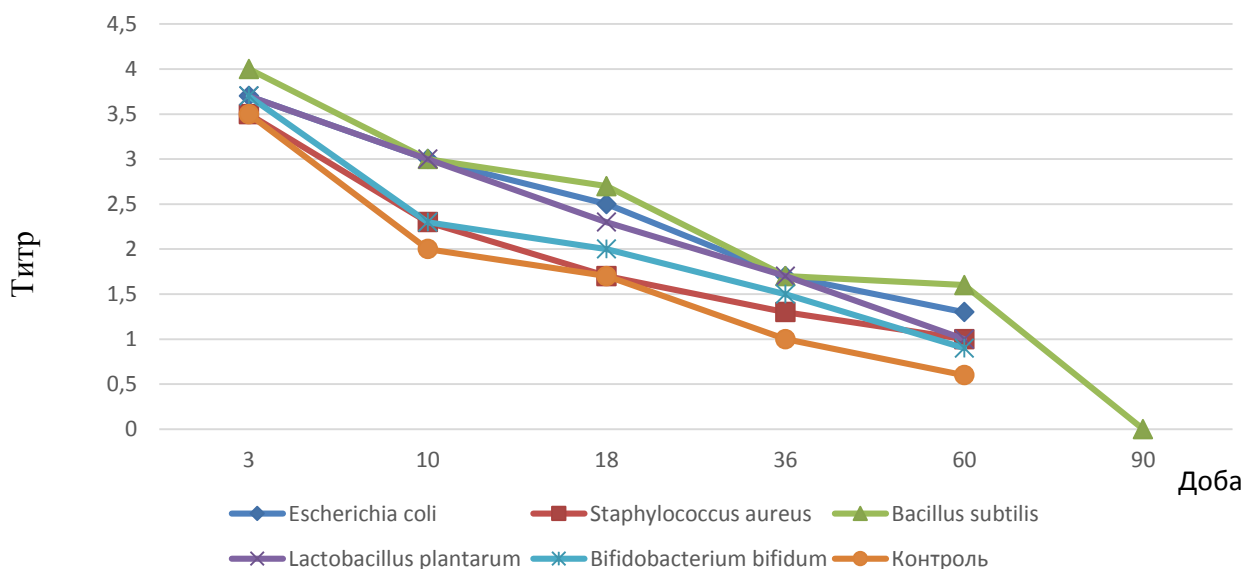


Рис. 6.11. Титр ентеровірусів після спільного зберігання з різними видами живих мікроорганізмів при температурі +20°C.

Примітка: титр виражений в $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл

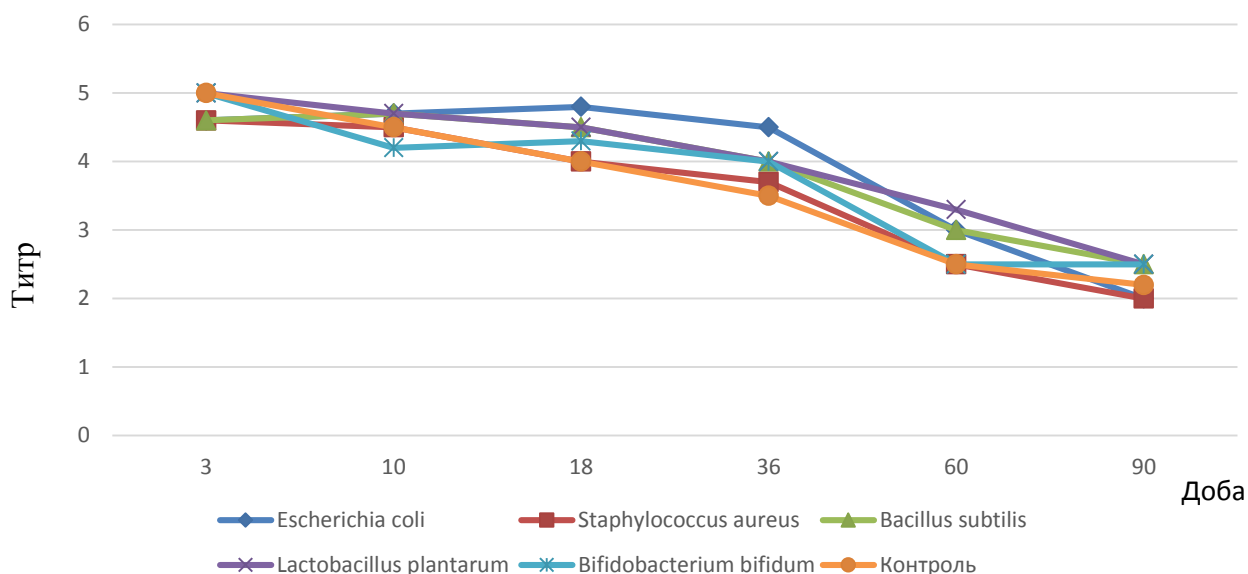


Рис. 6.12. Титр ентеровірусів після спільного зберігання з різними видами інактивованих мікроорганізмів при температурі +4°C.

Примітка: титр виражений в $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл

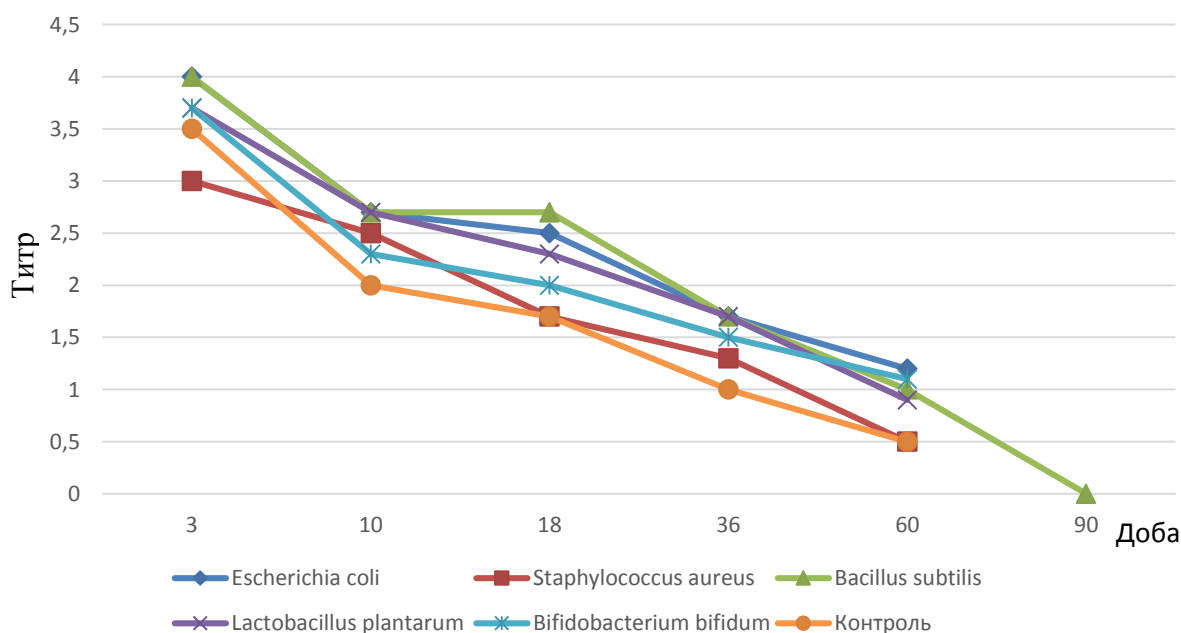


Рис. 6.13. Титр ентеровірусів після спільного зберігання з різними видами інактивованих мікроорганізмів при температурі +20°C.

Примітка: титр виражений в $-\log$ ТЦД₅₀/100 мкл

На 18 добу зберігання ентеровірусів в присутності живих мікроорганізмів за температури +37°C найвищий титр був зафіксований в

зразках, де вони знаходились в одному середовищі з *Escherichia coli* (ATCC 25922) та *Bacillus subtilis* (УКМ В-5020). Разом з тим, присутність у вірусомісному матеріалі *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Lactobacillus plantarum* (8P-A3), *Bifidobacterium bifidum* (№ 791), які знаходились у живому стані, майже не змінювала динаміки виживаності досліджуваних вірусів (рис. 6.14 А).

Тривалість збереження інфекційної активності ентеровірусів в присутності інактивованих форм вище вказаних видів мікроорганізмів показує близькі результати, що дає підстави стверджувати про те, що на збереження ентеровірусів не впливає присутність саме життєздатних бактерій (рис. 6.14 Б).

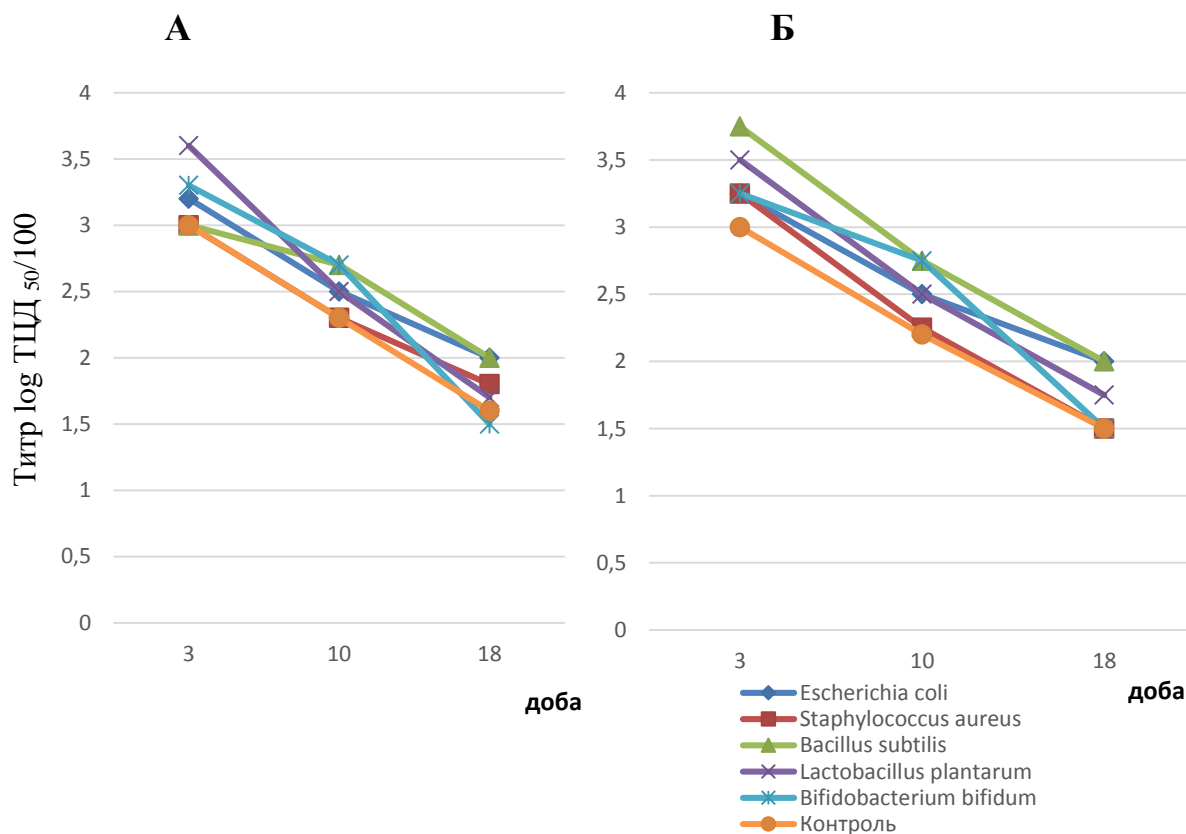


Рис. 6.14. Титр ентеровірусів після спільного зберігання з різними видами мікроорганізмів при температурі +37°C. А – живих; Б – інактивованих.

Висновки до розділу 6.

Порівняльно вивчено можливість використання різних груп антибактеріальних препаратів для формування дисбіотичних порушень у тварин та розроблено ефективну модель дисбіозу у мишей шляхом використання комбінації ампіциліну і метронідазолу. Доведено здатність декаметоксину потенціювати дію антибіотиків в процесі моделювання дисбіотичних станів

Виявлено властивість живих монопробіотичних препаратів на основі *L. plantarum*, *L. fermentum*, *B. bifidum*, *E. coli*, а також і мультипробіотичних, на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter*, скорочувати тривалість виділення вірусів поліомієліту у тварин з непорушеним мікробіоценозом кишківника. Натомість, показано зростання тривалості виживання ентеровірусів *in vitro* за умов присутності в середовищі деяких видів мікроорганізмів бактеріальної природи.

Результати досліджень, які увійшли до розділу, опубліковані в наступних роботах:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків / Г. К. Палій, О. А. Назарчук, Бобир В. В., О. О. Гончар,

Т. Л. Гридина, Д. В. Палий, І. В. Коваленко, В. М. Буркот. Мікробіологія і біотехнологія. 2015. №4. С. 67-74.

5. 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. – 158.

6. 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.

7. Аналітичне прогнозування чутливості до аміноглікозидів *Pseudomonas aeruginosa* / О. А. Назарчук, Д. В. Палий, В. І. Нагайчук, Н. І. Осадчук, Е. Кьоніг, В. В. Бобир. *Вісник морфології*. 2016. Т. 22. №2. С. 222-224.

8. 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.

РОЗДІЛ 7

СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПРИ ДИСБІОЗІ КИШКІВНИКА ТА ВПЛИВ ВІРУСІВ НА ЦЕЙ ПРОЦЕС

Сьогодні дисбіозом найчастіше визначають такий стан мікробної екосистеми, при якому спостерігається одночасне порушення функцій та механізмів взаємодії її ключових компонентів: макроорганізму та індигенної мікробіоти, асоційованої зі слизовими оболонками порожнин та шкірних покривів [53]. Очевидно, в основі всіх цих процесів лежать зміни, викликані якісними та кількісними порушеннями нормофлори кишківника, які проявляються на ультраструктурному рівні.

В сучасній літературі відомості про структурно-морфологічні порушення при дисбіозах представлені досить фрагментарно і не формують повної морфологічної картини. Важливим є також той факт, що закономірності розвитку дисбіотичних процесів у кишківнику людини мало чим відрізняються від тих, які відбуваються у кишківнику інших ссавців і це полегшує методологію їх дослідження, дозволяючи в подальшому екстраполювати результати на людський організм [98].

7.1 Особливості структурно-морфологічних змін при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника

Враховуючи обмежену кількість даних літератури про зміни ультраструктури кишківника при дисбіозах, перед тим як вивчити вплив вірусного чинника на глибину таких порушень, проведено аналіз структурних особливостей кишківника тварин безпосередньо після формування

антибіотикоіндукованого дисбіозу. Експериментальною моделлю для цього слугували безпородні білі миші ($n=40$; (20 – дослідних та 20 контрольних).

Моделювання дисбіозу у тварин проводили за вище описаною методикою [229]. Забій і розтин тварин здійснювали на шостий день експерименту. Для електронно-мікроскопічного дослідження шматочки тонкої кишки розмірами 1 мм^3 спочатку фіксували буферним розчином глютаральдегідного фіксатору 1 год, потім, після промивання буфером, дофіксували протягом 1 год забуферним розчином 1% тетроксиду осмію. Після дегідратації в етанолі зростаючої концентрації та ацетоні матеріал заливали в суміш епоксидних смол (епон та аралдит) і полімеризували при температурі $+ 60^\circ\text{C}$ протягом 36 годин. Зрізи одержували з використанням скляних ножів на ультрамікротомі «LKB III, Швеція» та досліджували в електронних мікроскопах Jeol JEM 100 CX II (Японія) та ПЕМ-125 (Україна). Перед мікроскопуванням зрізи контрастували уранілацетом та цитратом свинцю за стандартною методикою [255, 256].

Використаний спосіб моделювання дисбіозу дозволив визначити якісні та кількісні порушення складу нормальної мікрофлори кишківника тварин, які підтверджені бактеріологічно. В результаті проведених електронно-мікроскопічних експериментів з подальшим патоморфологічним аналізом було встановлено, що використання антибактеріальних препаратів у вищезазначених дозах призводить до візуального укорочення довжини мікрворсинок слизової оболонки, а місцями їх редукції (зникнення) чи деструкції з подальшим розпадом (рис. 7.1, 7.2), у порівнянні з контролем (рис. 7.3). При цьому часто також відмічали тотальну десквамацію мікрворсинок, у таких клітин щіточкова облямівка була відсутня, плазматична мембрана згладжена, а у самих ентероцитах відмічали набряклість мітохондрій та формування аутофагосом. Крім того, слід відмітити також зростання інтенсивності просвітлення матриксу цитоплазми, яке свідчило про незначний набряк. Водночас, замикальна пластинка контактів була значно стоншена – в результаті чого між клітинами спостерігали розширення контактів [323, 324].

Крім того, встановлено, що формування дисбіотичних порушень супроводжувалось порушенням зв'язку між епітеліальними клітинами за рахунок розширення міжклітинного простору.

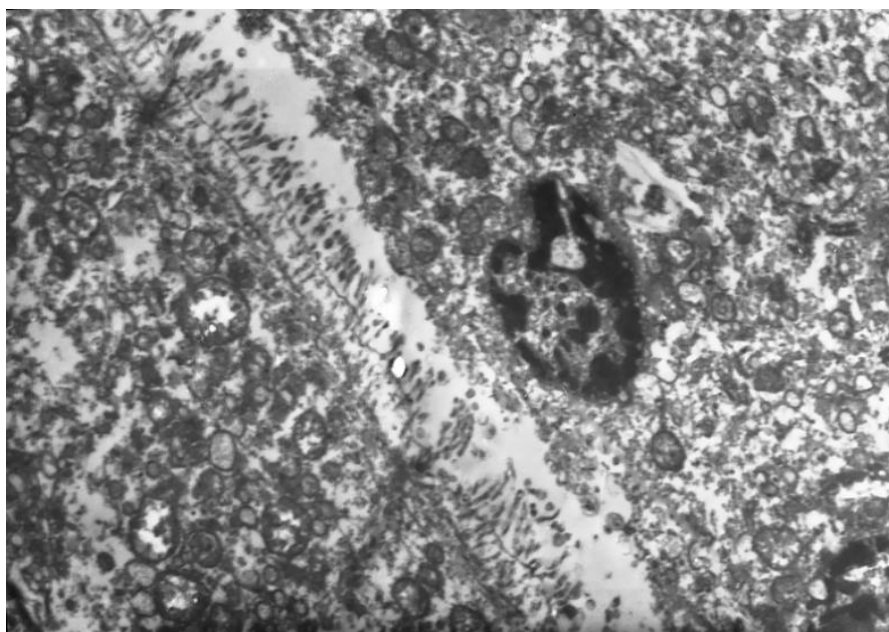


Рис. 7.1. Електронна мікрофотографія. Локальна редукція щіткової облямівки ентероцитів тонкого кишківника миші при антибіотикоіндукованому дисбіозі. Збільшення 4200×.

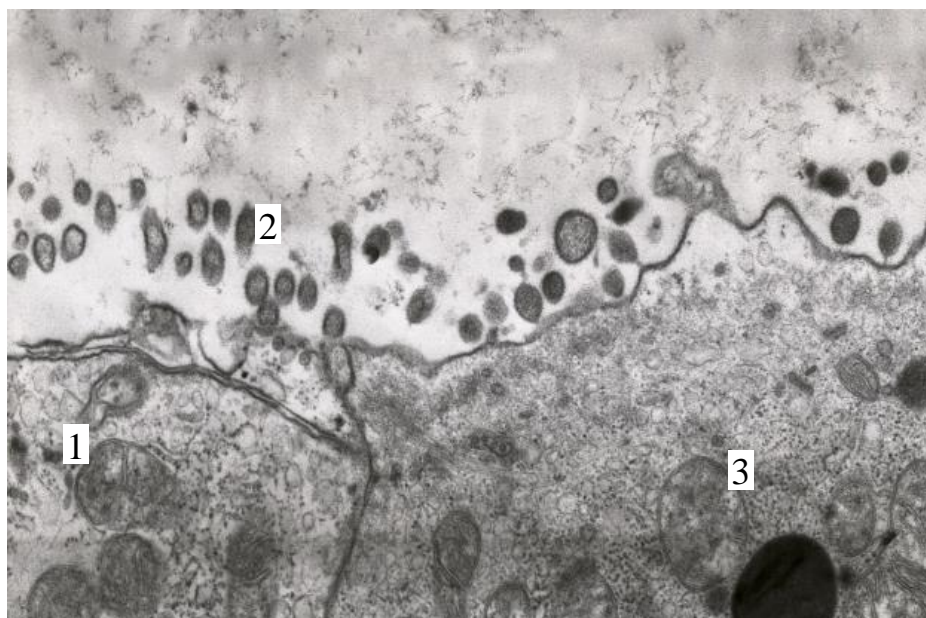


Рис. 7.2. Електронна мікрофотографія. Десквамовані мікрворсинки. Збільшення 4200×. 1 – аутофагосома; 2 – мікрворсинки; 3 – мітохондрії.

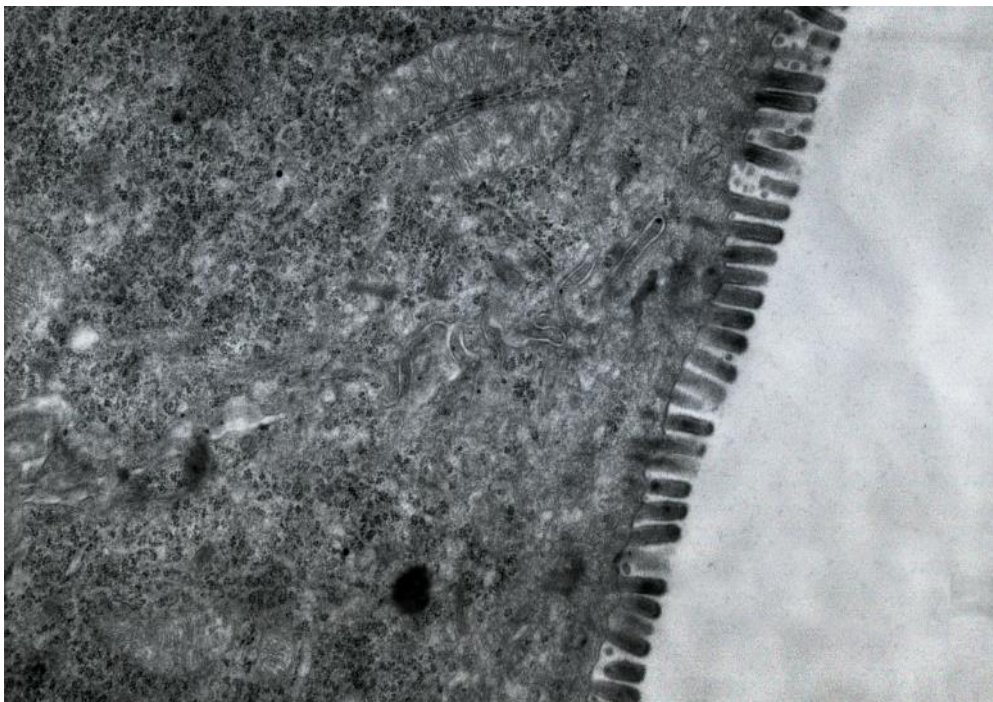


Рис 7.3. Електронна мікрофотографія. Щіточкова облямівка ентероцитів тонкого кишківника миші. Контроль. Збільшення 4200×.

Проведені експерименти дозволили встановити 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 зі зразків) (рис. 7.4).

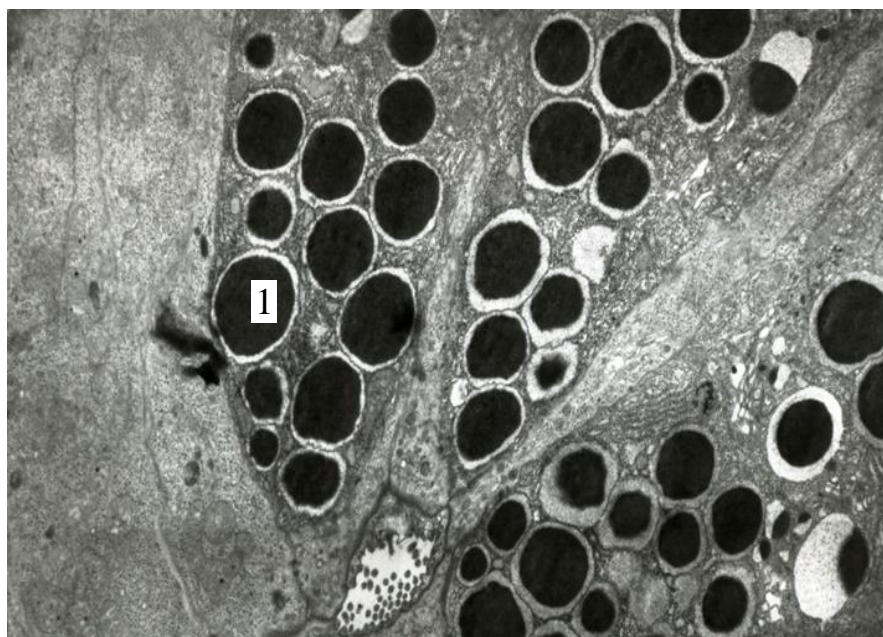


Рис. 7.4. Електронна мікрофотографія. Скупчення клітин Панета після формування дисбіотичних станів. Гранули клітин Панета (1). Збільшення 4200×.

На потужну відповідь з боку імунної системи вказує і 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 зі зразків, а також той факт, що на деяких електронних мікрофотографіях чітко простежується розширення канальців плазматичних клітин, очевидно, за рахунок їх наповнення імуноглобулінами (рис. 7.5).

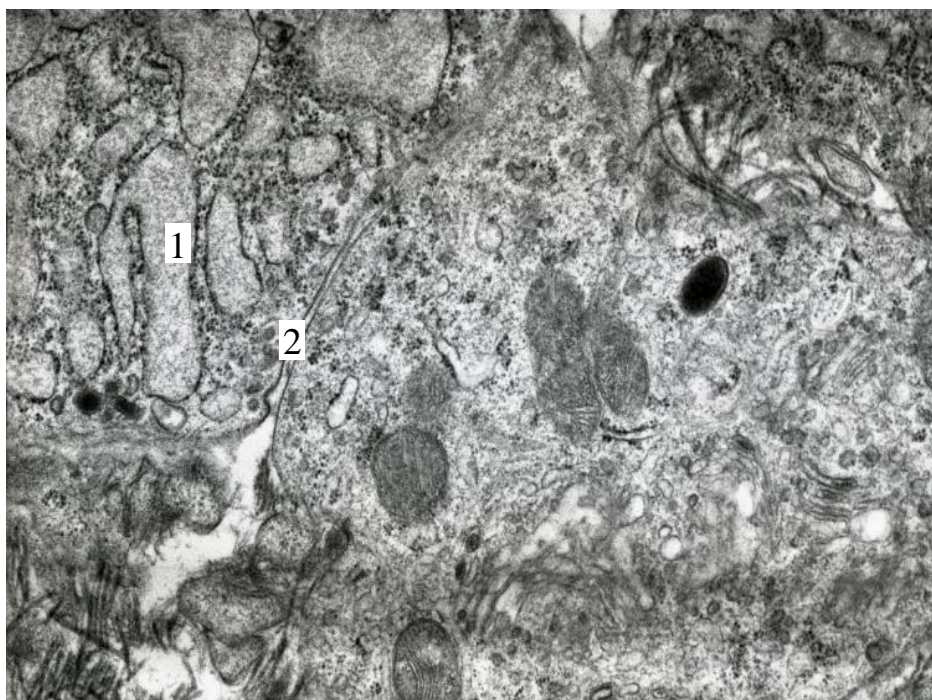


Рис. 7.5. Електронна мікрофотографія. Власна пластинка слизової оболонки. Плазматична клітина (1). Розширені каналці плазматичних клітин (2). Збільшення 4200×.

Аналіз електронних мікрофотографій засвідчив також, що при антибіотикоіндукованому дисбіозі відмічається зростання числа просвітних еозинофілів і базофілів ($12,6 \pm 2,4$ у тварин з дисбіозом та $3,8 \pm 0,92$ у тварин контрольної групи, $P < 0,05$, за результатами досліджень 30 квадратів кожного зі зразків), які є показником алергічних реакцій, оскільки беруть безпосередню участь в захисних алергічних та анафілактичних реакціях організму (рис. 7.6).

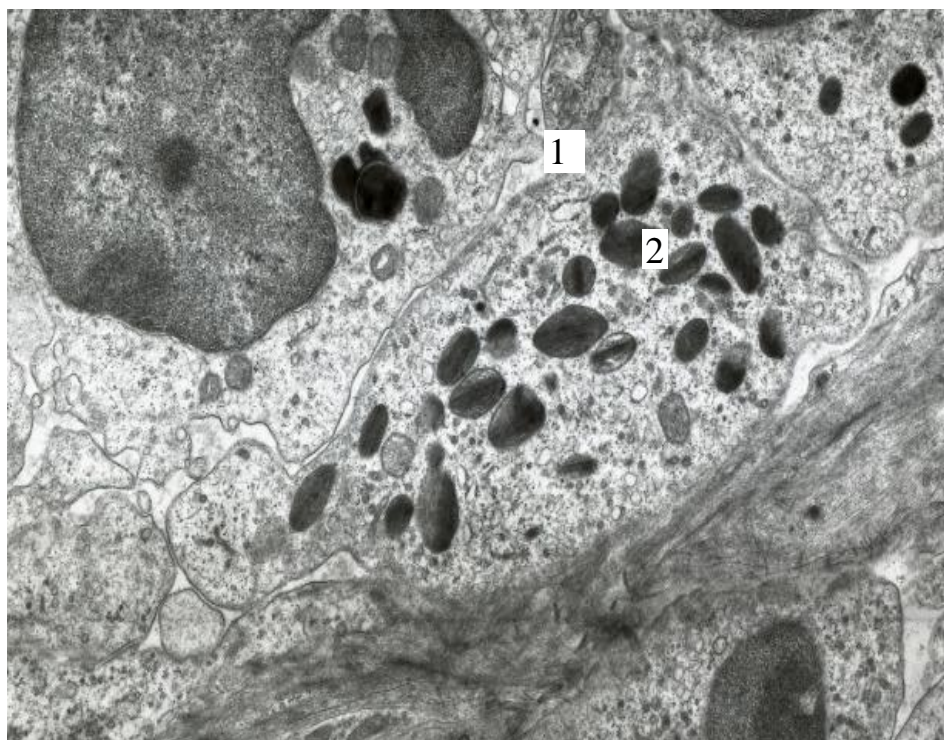


Рис. 7.6. Електронна мікрофотографія. Еозинофіли у просвіті капіляра (1) з характерними видовженими гранулами із серцевиною (2). Збільшення 4200×.

Про формування імунної відповіді свідчило і зростання кількості В-лімфоцитів між ентероцитами та у просвіті капілярів (рис. 7.7). ($5,4 \pm 1,72$ у тварин з дисбіозом та $1,8 \pm 0,41$ у тварин контрольної групи, $P < 0,05$ за результатами досліджень 30 квадратів кожного зі зразків).

Таким чином, вдалось показати здатність антибактеріальних препаратів формувати у тварин дисбіотичні стани, які супроводжуються вираженими цитодеструктивними порушеннями в епітелії тонкого кишківника, а саме вкороченням та десквамацією мікроворсинок, набряком мітохондрій, просвітленням матриксу цитоплазми та порушенням зв'язку між епітеліальними клітинами. Крім того, зроблено аргументоване припущення про стимулюючий вплив антибіотикоіндукованого дисбіозу на активізацію імунних захисних реакцій. Це підтверджується зростанням кількості клітин Панета, плазматичних клітин, наповнених імуноглобулінами, просвітних

еозинофілів і базофілів, а також збільшенням кількості В-лімфоцитів, які реєструються між ентероцитами та у просвіті капілярів.

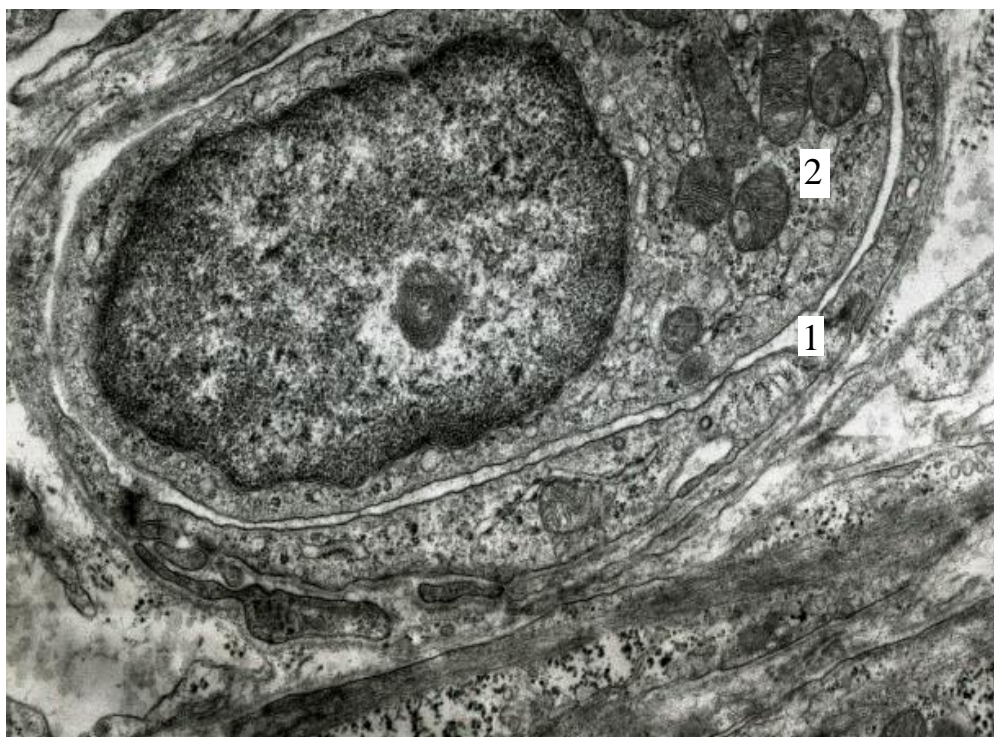


Рис. 7.7. Електронна мікрофотографія. Власна пластинка слизової оболонки тонкого кишківника. Просвіт капіляра (1) в якому знаходиться В-лімфоцит (2). Збільшення 4200×.

Отже, результати експериментальних досліджень переконливо доводять, що дисбіоз, який супроводжується вираженими порушеннями функцій та механізмів взаємодії макроорганізму і індигенної мікробіоти, може супроводжуватись змінами структурних компонентів кишківника на ультраструктурному рівні.

7.2 Дослідження структурних змін у внутрішніх органах тварин при вірусних та вірусно-бактеріальних процесах, що розвиваються на фоні антибіотикоіндукованого дисбіозу

Спочатку проведено дослідження порівняльної чутливості мишей з дисбіозом кишківника та тварин з непорушеною мікрофлорою до вірусів Коксакі В3, сальмонел та їх комбінацій. Для цього в якості моделі обрано білих мишей, використання яких дає можливість отримати інформацію, максимально наближену до організму людини відносно особливостей патогенезу, клінічних симптомів, імунної реакції або інших складових комплексної відповіді організму на інфекцію. Проте, моделювання ентеровірусних інфекцій на тваринах має певні особливості, що, в першу чергу, обумовлені їх вибірковою чутливістю до окремих видів ентеровірусів. Так, для вірусів Коксакі В ефективними моделями є лабораторні миші 1-3 денного віку, серед поліовірусів лише другий серотип викликає клінічні симптоми у дорослих мишей, і то виключно при парантеральному введенні, а до вірусів ЕСНО миші взагалі не чутливі. В цілому слід відмітити, що попри наявність певної кількості наукових праць, присвячених моделюванню ентеровірусної інфекції у тварин, детальної інформації щодо особливостей перебігу та факторів, які впливають на інфекційний процес, є недостатньо.

В якості тестових вірусів використано віруси Коксакі В3. Інфікування тварин вірусами здійснювали (в/о) 10^6 ТЦД₅₀/100 мкл на тварину. Вибір серотипу Коксакі В3 для моделювання інфекційних процесів обумовлено його доведеною вірулентністю для мишей та виразним поліорганичним тропізмом, що в рамках одного блоку експериментів дає змогу дослідити вплив вірусної інфекції на різні органи і системи. Разом з тим, якщо питання вірусно-бактеріальних асоціацій загалом вивчається доволі інтенсивно, то ідея моделювання патогенного впливу таких асоціацій на тваринах зі сформованим дисбіозом є новою.

Формування дисбіотичних станів проводили за описаною раніше методикою з використанням антибактеріальних препаратів [229].

Експериментальний сальмонельоз моделювали шляхом інфікування мишей патогенним штамом *Salmonella typhimurium*, виділеним та ідентифікованим в Київській міській клінічній лікарні №4 (клінічний ізолят №7683). Інфікування тварин бактеріями проводили внутрішньоочеревинно (в/о) в об'ємі 0,5 мл (1 млрд мікробних тіл) на одну особину. Об'єктами досліджень слугували білі лабораторні миші лінії *BALB/c*. Всього в даному експерименті використано 210 мишей, які були поділені на 7 груп (по 30 тварин у кожній групі). 1 група – тварини з відсутніми дисбіотичними розладами, які інфіковані Коксакі В3; 2 група – тварини з відсутніми дисбіотичними розладами, інфіковані сальмонелами; 3 група – тварини з відсутніми дисбіотичними розладами, інфіковані сальмонелами та Коксакі В3; 4 група – тварини з дисбіозом, інфіковані Коксакі В3; 5 група – тварини з дисбіозом, інфіковані сальмонелами; 6 група – тварини з дисбіозом, інфіковані Коксакі В3 та сальмонелами; 7 група – інтактна, контрольна. Термін спостереження за тваринами становив 21 добу. Порівняльну чутливість мишей до вірусів Коксакі В та сальмонел вивчали за такими показниками, як смертність та наявність проявів (зниження активності, млявість, тремтіння, настовбурченість шерсті, діарея). Падіж тварин при інфікуванні вірусами Коксакі В3 спостерігали на 3-6 добу, а при інфікуванні сальмонелами – на 3-4 добу. Виведення частини тварин з дослідження та вивчення структурно-морфологічних змін внутрішніх органів проводили через 24 години після інфікування.

Результати, представлені в табл. 7.1, свідчать про відсутність статистично достовірної різниці захворюваності та смертності тварин у групах мишей з дисбіотичними розладами та тварин зі збереженою мікрофлорою, які були інфіковані вірусом Коксакі В ($P > 0,05$): смертність мишей в обох групах визначали в межах 16,66% - 20,0%, а ознаки захворювання спостерігали в 23,33% випадків у тварин зі збереженою мікрофлорою та у 26,66% випадків у тварин з дисбіозом. При моделюванні експериментального сальмонельозу смертність тварин в досліді була дещо нижчою у порівнянні з даними інших науковців, які відмічали падіж тварин на рівні близько 50% [325]. У мишей зі

збереженою мікрофлорою смертність складала 16,66%, а в групі тварин з дисбіозом вона зростала на 6,66% і становила 23,33%, в той час як частота проявів інфекції в групі тварин зі збереженою мікрофлорою становила 20%, а у тварин з дисбіозом – 30% [326]. В групі тварин, де проводили моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні вираженого антибіотикоіндукованого дисбіозу, зафіксовано зростання падіжу тварин на 20% та збільшення частоти проявів хвороби на 16,66% в порівнянні з групою вірусно-бактеріальних інфекцій, на яких проводили експеримент без формування дисбіотичних станів (табл. 7.1), хоча дані не можна вважати достовірними ($P > 0,05$).

Таблиця 7.1

**Порівняльна чутливість мишей з дисбіозом кишківника до вірусів
Коксакі В3, сальмонел та їх комбінацій**

Прояв	Збудник					
	Коксакі В3 (n=30)	Сальмо- нели (n=30)	Коксакі В3 + сальмо- нели (n=30)	Коксакі В3 (n=30)	Сальмо- нели (n=30)	Коксакі В3 + сальмо- нели (n=30)
	Тварини зі збереженим мікробіоценозом			Тварини з дисбіозом		
Смерть	16,66 (n=5)	16,66 (n=5)	23,33 (n=7)	20,0 (n=6)	23,33 (n=7)	43,33 (n=13)
Ознаки хвороби	23,33 (n=7)	20,0 (n=6)	30,0 (n=9)	26,66 (n=8)	30,0 (n=9)	46,66 (n=14)
Без змін	60,0 (n=18)	63,33 (n=19)	43,33 (n=13)	53,33 (n=16)	46,66 (n=14)	10,0 (n=3)

Примітки: цифрами у таблиці позначено середню частоту виявлення ознаки, %.

Слід відмітити, що невелика кількість використаних в експерименті тварин не дозволяє проводити кореляційного аналізу поєднання летальності та проявів захворювання у тварин з формуванням у них дисбіотичних розладів, через що одержані дані не можна вважати остаточними.

Подальші дослідження були направлені на з'ясування особливостей структурно-морфологічних порушень у внутрішніх органах тварин, зокрема в тонкому кишківнику, печінці та селезінці, які формуються при дисбіотичних порушеннях на фоні вірусних та вірусно-бактеріальних інфекцій. Вони здійснювались у два етапи: перший етап включав порівняльне дослідження ультраструктурних змін слизової оболонки тонкого кишківника тварин з дисбіотичними порушеннями та мишей зі збереженою мікрофлорою інфікованих вірусами Коксакі В. На другому етапі порівнювали ультраструктурні зміни у внутрішніх органах (тонкому кишківнику, печінці, селезінці) тварин з дисбіозом та мишей з непорушеним мікробіоценозом після їх інфікування бактеріями (сальмонели) і вірусно-бактеріальною сумішшю (віруси Коксакі В та сальмонели).

Орієнтуючись на публікації, в яких йдеться про максимальний час накопичення ентеровірусів у відповідних органах і системах організму тварин та тривалість їх циркуляції, забій тварин здійснювали на 3 добу після інфікування [327].

При електронно-мікроскопічному дослідженні зрізів тонкого кишківника від тварин зі збереженою мікрофлорою, які були інфіковані вірусом Коксакі В (дослідна група 1), деструктивних змін не виявлено, що в першу чергу може свідчити про низьку чутливість використаних в експерименті тварин до даних збудників та про нездатність ентеровірусів бути окремим етіологічним фактором формування дисбіотичних процесів у мишей з відповідними патоморфологічними змінам у кишківнику. Водночас, у порівнянні з групою тварин, інфікування яких ентеровірусами відбувалось на фоні не порушеного мікробіоценозу кишківника, у групі тварин з дисбіотичними розладами, інфікованих ентеровірусами, крім морфологічних

зміни, характерних для дисбіозу і детально охарактеризованих в попередньому розділі, зафіксовано потужну активізацію апоптозних процесів. Вони проявлялись вираженим ущільненням ядер та цитоплазми ентероцитів, очевидно, за рахунок деструкції міжклітинних контактів. На представлених електронних мікрофотографіях ядра відмічались деформовані, з утворенням апоптозних тільць, які в подальшому зміщувались до базальної мембрани та вилучались з ряду клітин, наразі органели таких клітин, також зазнавали апоптозних змін (рис. 7.8).

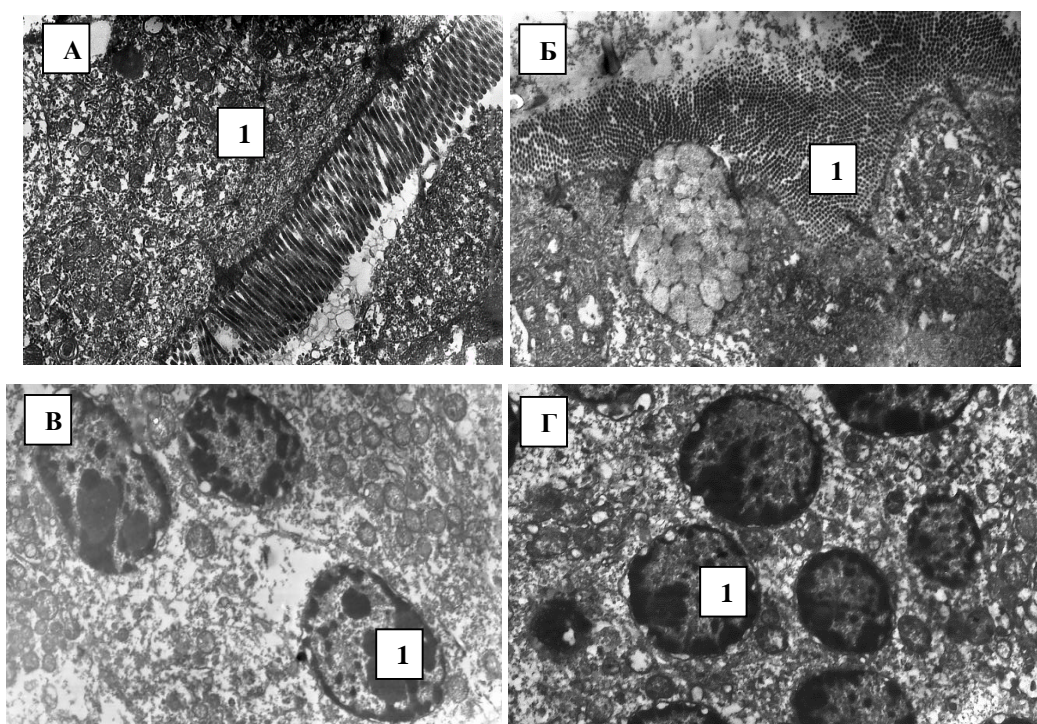


Рис. 7.8. Електронна мікрофотографія. А. Виражений апоптоз ентероцитів тонкої кишки після інфікування вірусами Коксакі В. Збільшення 4200×. Б-Г. Загибель ентероцитів (1). Збільшення 19200×.

Порівняльний ультраструктурний аналіз тканин печінки, селезінки та тонкого кишківника тварин з дисбіозом, інфікованих окремо сальмонелами та інфікованих вірусно-бактеріальною сумішшю (дослідна група 5 та 6 відповідно), дозволив встановити виразні зміни в даних органах і

сформулювати гіпотезу, що саме вірусний фактор має провідне значення в патогенезі вірусно-бактеріальних інфекцій, змодельованих на фоні дисбіотичних процесів кишківника, поглиблюючи їх прояви вже на ультраструктурному рівні. Так, в кишківнику тварин з дисбіозом після вірусно-бактеріального інфікування визначали зазначені порушення у вигляді тотальної десквамації мікроворсинок, відсутності щіткової облямівки, згладженості плазматичної мембрани, набряку мітохондрій та формування аутофагосом (рис. 7.9).

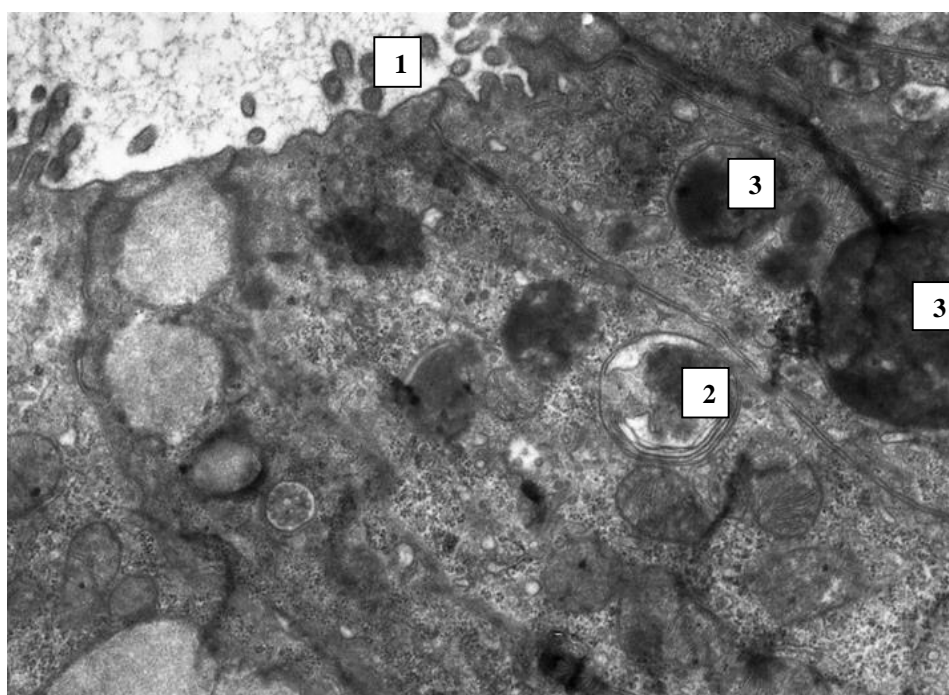


Рис. 7.9. Електронна мікрофотографія. Кишківник мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*. Десквамація мікроворсинок епітеліоцитів (1), цитоплазма, яких виповнена аутофагосомами (2) та лізосомами (3). Збільшення 19200 \times .

В деяких ентероцитах також розвивались апоптозні зміни, що супроводжувались ущільненням цитоплазми, органел та формуванням апоптозних тілець, які зміщувались до апікальної мембрани та вилучалися з ряду епітеліальних клітин (рис. 7.10). Мікробні клітини виявляли як у

епітеліальній пластинці слизової оболонки, так і в просвіті кишківника, в оточенні слизу та клітинного детриту (рис. 7.11А). Відмічались незначні розлади у гемомікроциркуляторному руслі та дистрофічні зміни у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі кишківника. Характерним також була міграція нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів в інтерстицій кишківника, розширення і набряк інтерстиційного простору, в якому виявляли вільні мікробні клітини (рис. 7.11 А, Б).

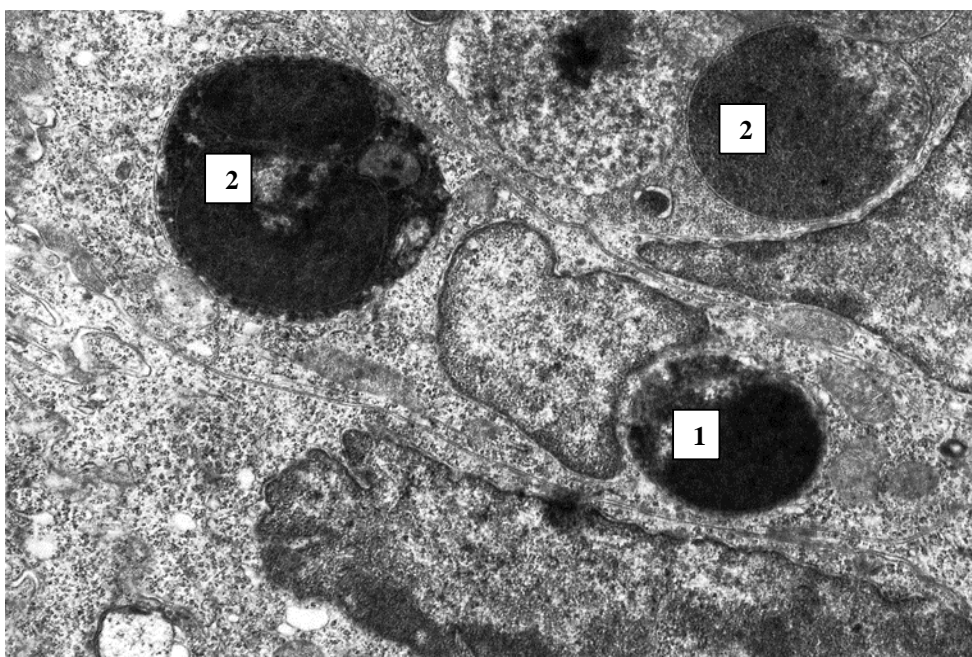


Рис. 7.10. Електронна мікрофотографія. Кишківник мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*: лімфоцит (1), ентероцити з апоптозними тільцями (2). Збільшення 12000×.

В цих місцях виявлялися активовані макрофаги, в цитоплазмі яких були присутні мікробні тіла без ознак деструкції, що слід вважати явищем ендоцитобіозу. Відмічали й дистрофію поверхневих епітеліоцитів та зростання числа нейтрофілів. Мікроорганізми накопичувались у цитоплазмі епітеліоцитів з переважною локалізацією навколо ядра. Водночас спостерігали

посилену інфільтрацію слизової оболонки макрофагами. При інфікуванні мишей з дисбіозом лише сальмонелами (дослідна група 5), а також при інфікуванні вірусно-бактеріальною сумішшю тварин з непорушеною мікрофлорою (дослідна група 3), ультраструктурні зміни кишківника не відрізнялись від описаної раніше мікроскопічної картини, характерної для антибіотикоіндукованого дисбіозу (рис. 7.1-7.3).

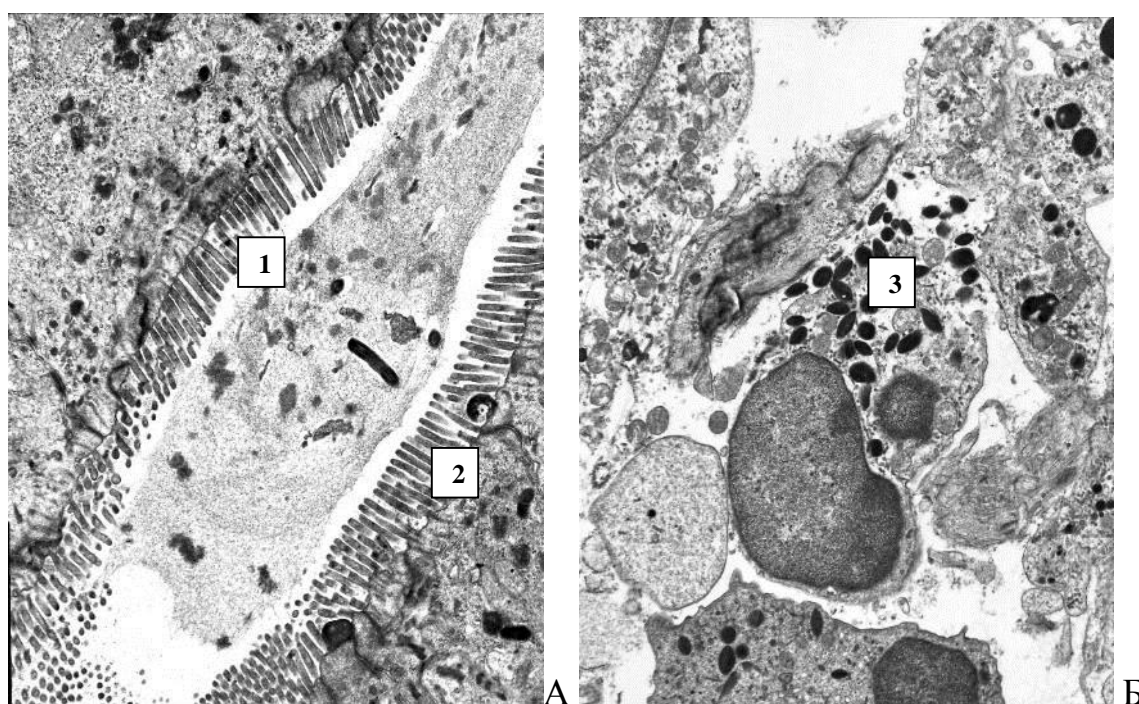


Рис. 7.11. Електронна мікрофотографія. Кишківник мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*: просвіт кишківника (1), облямівка епітеліоцитів (2) (А), еозиноцити у зоні запалення (3) (Б). Збільшення 12000×(А), 9600× (Б).

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, зокрема в селезінці

виявлено зниження об'ємної частки періартеріальних лімфоїдних муфт та збільшення частки світлих центрів лімфоїдних вузликів (рис. 7.12).

Очевидно, дисбіоз поглиблює запальний процес і ініціює імунну перебудову організму мишей. Це ще раз дозволяє підтвердити думку, що дисбіоз – явище загальне, а не місцеве. Не виключено, що одночасне введення мишам даних збудників призводить до активізації імунокомпетентних клітин селезінки, що проявлялось підвищенням кількості виявлених лімфобластів, плазматичних клітин з розширеними каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки, де, як відомо, виробляються гамма-глобуліни (рис. 7.13).

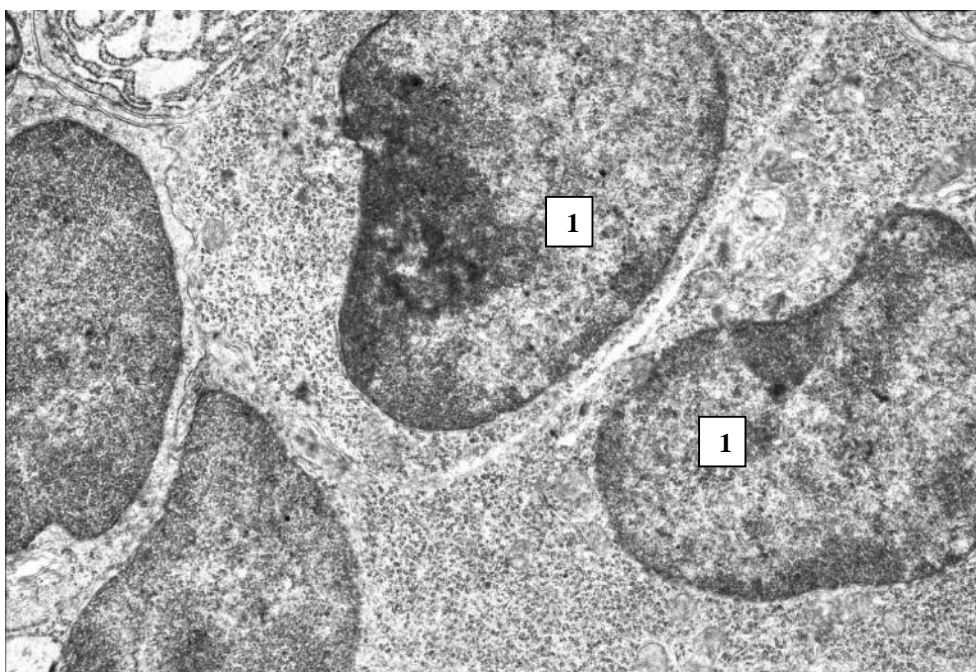


Рис. 7.12. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*: скупчення лімфобластів білої пульпи (1) Збільшення 11200×.

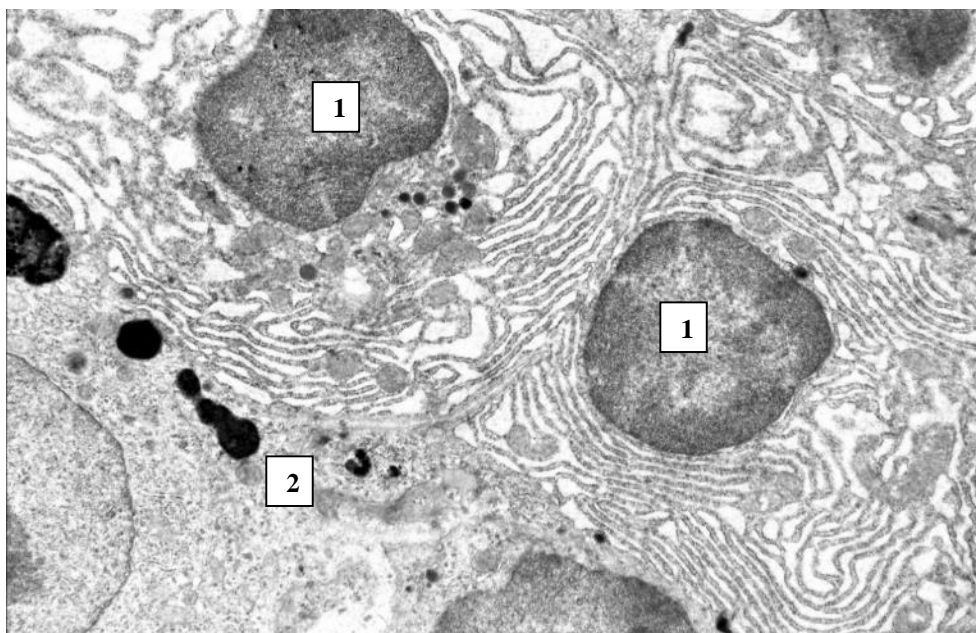


Рис. 7.13. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*. Плазмоцити (1), фрагмент макрофага (2). Збільшення 11200×.

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 (рис. 7.14 А,Б).

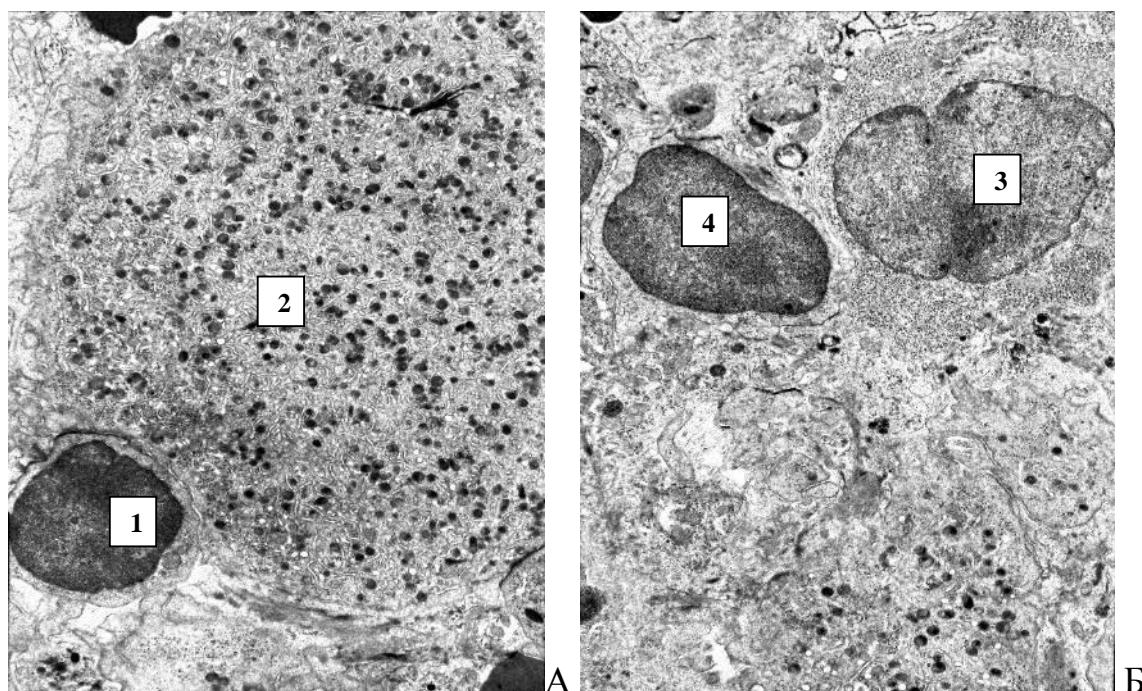


Рис. 7.14. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*. Т-лімфоцит (1), гігантська клітина з включеннями у цитоплазмі (2) (А), атрофія епітеліальних клітин на периферії гранульоми в оточенні лімфобласту (3) та макрофага (4) (Б). Збільшення 7000×.

Як показано на рис. 7.15 А-Г, при одночасному введенні мишам вірусу Коксакі В та сальмонел у печінці відмічаються суттєві зміни як у синусоїдних капілярах, так і у гепатоцитах [326]. У цих структурах реєстрували некротичні зміни, що проявлялось просвітленням ядер у результаті порушення співвідношення еу- та гетерохроматину. Цитоплазма гепатоцитів характеризувалась повним або частковим цитолізом, розчиненням в основному цитозоля. Відмічали загибель 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.

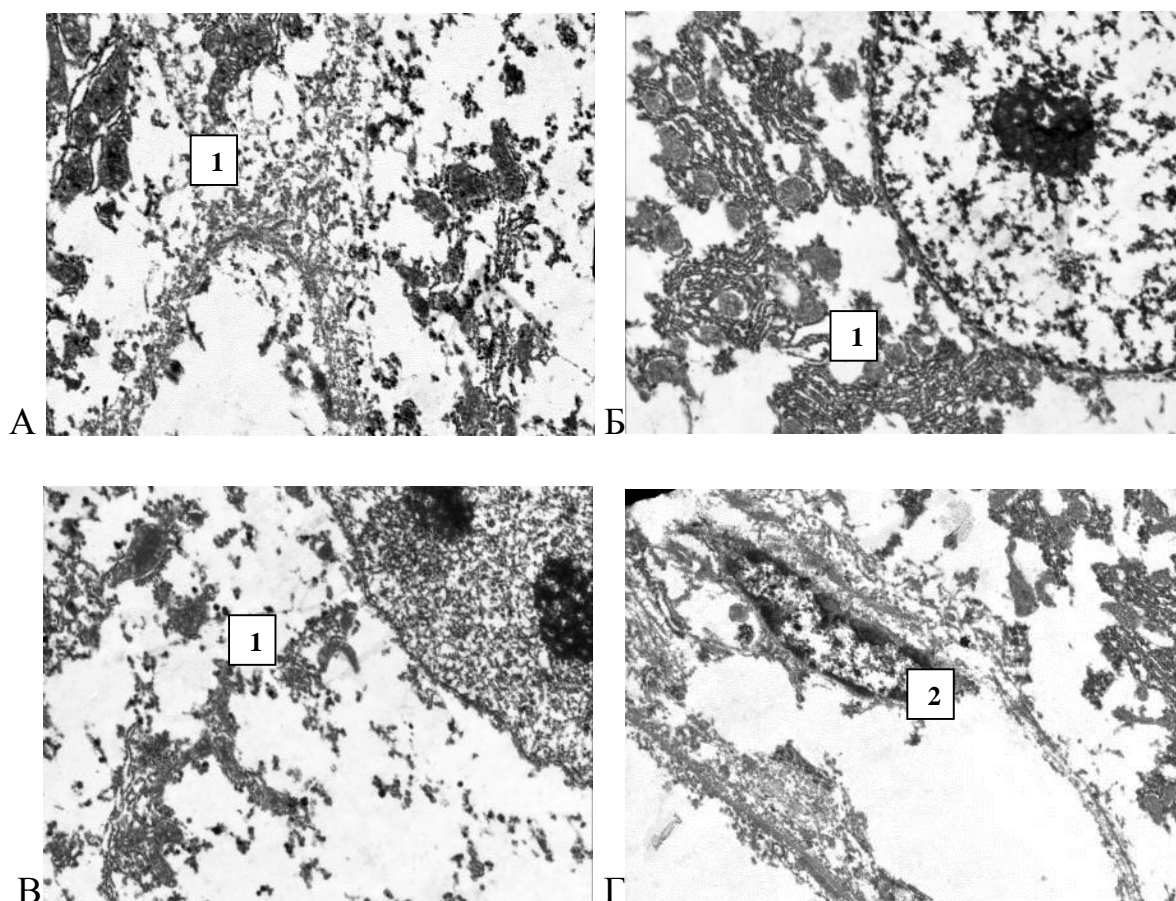


Рис. 7.15. Електронна мікрофотографія. Печінка мишей з дисбіозом після інфікування вірусами Коксакі В та *Salmonella typhimurium*. Некротичні зміни у гепатоцитах (1) і синусоїдних капілярах (2) Збільшення 12000×.

Подібні зміни у печінці спостерігали і при інфікуванні тварин з дисбіозом самими сальмонелами, проте в такому випадку вони мали вогнищевий характер, але при моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіотичних розладів описані порушення набували генералізованого характеру.

Некротичні процеси в печінці, які розвиваються у дітей на фоні ентеровірусної інфекції з блискавичним перебігом та часто закінчуються летально, описувались і раніше [328], проте у тварин нам вдалось експериментально їх зафіксувати лише при моделюванні змішаної (вірусно-

бактеріальної) патології і виключно на фоні штучно сформованого антибіотикоіндукованого дисбіозу.

Висновки до розділу 7.

Експериментальними дослідженнями показано, що дисбіоз, для якого притаманні порушення функцій та механізмів взаємодії макроорганізму і індигенної мікробіоти, супроводжується змінами у кишківнику на ультраструктурному рівні, які проявляються вкороченням та десквамацією мікроворсинок, набряком мітохондрій, матриксу цитоплазми, порушенням зв'язку між епітеліальними клітинами. Крім того, зроблено аргументоване припущення про стимулюючий вплив антибіотикоіндукованого дисбіозу на активізацію імунних захисних реакцій, що підтверджується зростанням кількості клітин Панета, плазматичних клітин, наповнених імуноглобулінами, еозинофілів і базофілів, а також збільшенням числа В-лімфоцитів, які виявлялись між ентероцитами та у просвіті капілярів.

Ультраструктурний аналіз порушень у внутрішніх органах тварин, зокрема в тонкому кишківнику, печінці та селезінці, які формуються при дисбіотичних порушеннях на фоні вірусних та вірусно-бактеріальних інфекцій, дозволив визначити вірусний фактор як ключовий елемент, що визначає глибину ультраструктурних порушень з формуванням виражених апоптозних змін.

Вірусний компонент здатний поглиблювати перебіг змодельованих вірусно-бактеріальних інфекцій у тварин, які розвиваються на фоні дисбіотичних станів, що в першу чергу проявляється збільшенням летальності та зростанням частоти проявів хвороби, а також посиленням дегенеративних змін у внутрішніх органах тварин на ультраструктурному рівні та більш вираженою, у порівнянні з контролем, імунною відповіддю. Зроблено також припущення, що ентеровіруси ініціюють розвиток некротичних змін генералізованого характеру у печінці, які проявляються просвітленням ядер у результаті порушення співвідношення еу- та гетерохроматину, повним або

частковим цитолізом цитоплазми гепатоцитів, а також ущільненням та загибеллю більшості органел.

Результати експериментальних досліджень розділу 7 наведено в таких публікаціях:

1. 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.
2. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis /V. V. Bobyr, L. O. Stechenko, V. P. Shyrobokov, O. I. Kryvosheyeva, O. A. Nazarchuk, V. A. Poniatovskyi, S. M. Chuhrai. Report of morphology. 2019. №2, Vol.25. P. 78-84.
3. Бобир В. В. Особливості структурно-морфологічних змін при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвяченій 90-річчю акад. А. Я. Циганенка (24-26 червня 2019 року). Харків. 2019. С. 154.

РОЗДІЛ 8

НАУКОВЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ СОРБЕНТІВ ДЛЯ РЕГУЛЯЦІЇ МІКРОБІОТИ КИШКІВНИКА

В наш час досягнуто значних успіхів у розробці сорбційних матеріалів, які здатні активно зв'язувати в організмі людини токсичні речовини та мікроби і, тим самим, можуть служити основою для отримання ефективних комплексних лікарських антимікробних препаратів. Деякі з них вже активно застосовуються в різних галузях медицини, зокрема в клінічній практиці, для лікування гострих кишкових інфекцій, харчових токсикоінфекцій і інтоксикацій різного генезу, та інших патологічних процесів [329, 330, 331, 332, 333].

На фармацевтичному ринку України присутній значний асортимент різних за походженням ентеросорбентів, однак не всі вони можуть бути ефективними при дисбіозах, оскільки деякі з них здатні зв'язувати клітини кишкового мікробіому, що може призводити до поглиблення мікроекологічних порушень [91, 92, 104]. В таких умовах надважливим є пошук і відбір ентеросорбентів, які не впливають на стан приепітеліальної біоплівки, або навіть його покращують.

Серед сорбентів сьогодні широко використовують препарати на основі поліметилсилоксану, зокрема Ентеросгель – гідрогель метилкремнієвої кислоти [334, 335, 336, 337]. Не виключено, що вони здатні бути ефективними для корекції дисбіозів різної етіології і, в першу чергу, антибіотикоспровокованих, оскільки існує інформація, що для гідрогелю метилкремнієвої кислоти характерна вибіркова адсорбція мікроорганізмів, яка не порушує колонізації кишківника нормальною мікрофлорою [338, 339]. Іншими препаратами, які можуть бути ефективними в цьому плані, є ентеросорбенти на основі глинистих мінералів, поміж яких особливе місце посідають бентонітові глини (сметити), що в наш час, внаслідок своїх унікальних адсорбційних та іонообмінних властивостей, знаходять все ширше

застосування в різних галузях промисловості, сільському господарстві, ветеринарії та в медицині. Головними чинниками їх лікувальної дії є абсорбуючі та іонообмінні властивості, які дозволяють зв'язувати і виводити з організму токсини, гази, іони важких металів, радіонуклідів та ін. [53, 76, 116, 117, 120].

8.1 Дослідження впливу сорбентів на тривалість виділення ентеровірусів у мишей

У наведених нижче експериментах використано бентоніт, отримання якого дещо відрізнялось від того, який використовувався для вірусологічних досліджень (титрування, концентрування). Методика одержання класичного сорбенту бентоніту розроблена академіком В.П. Ширококовим [245]. Вдосконалений спосіб приготування бентоніту для медичних цілей передбачав подрібнення бентоніту, очищення від грубих часток і забруднюючих речовин з метою отримання максимально очищеного препарату. Він відрізняється від класичного методу тим, що бентоніт попередньо переводять у натрієву форму, а потім проводять операції, що чергуються, по суспензуванню й фракційному центрифугуванню суспензії бентоніту до одержання очищеної дрібнодисперсної фракції із вмістом сухих речовин 5-6 % [340].

Проведення багаточисельних операцій, які передбачали суспендування з наступним центрифугуванням суспензії бентоніту дозволило досягти високого рівню очищення гелю від сторонніх домішок і грубих часток, а також одержати дрібнодисперсну фракцію з високими адсорбційними, іонообмінними й вологозатримуючими властивостями.

Нами проведено порівняльне дослідження впливу сорбентів «Смектовіт» (Симбіогель) – гель бентоніту з контрольованим катіонним заміщенням (НВК «О.Д. Пролісок») та «Ентеросгель» – гідрогель метилкремнієвої кислоти (ПрАТ «ЕОФ «КРЕОМА-ФАРМ») на тривалість виділення вірусу поліомієліту у мишей зі збереженою мікрофлорою та з

штучно сформованим дисбіозом кишківника. Формування дисбіотичних станів у тварин здійснювали за розробленою раніше методикою [229]. Відбір фекальних мас та введення тваринам антибіотиків повторювали протягом 5 діб з щоденним визначенням загальної кількості фекальної мікрофлори та окремих її представників (ешерихій, біфідобактерій, лактобактерій).

Тварини отримували препарати в поїлці протягом всього періоду експерименту (кінцева концентрація обох сорбентів в поїлці була близько 1%). В досліді використано прототипий вакцинний штам вірусу поліомієліту першого типу (штам Lsc2ab). Наявність вірусу в фекальних масах тварин визначали щоденно починаючи з 2 доби, протягом двох тижнів після інюкуляції, класичним мікрометодом в реакції титрування з використанням культури клітин НEr-2 [12].

Спочатку досліджували вплив сорбентів на швидкість елімінації та інфекційні титри ентеровірусів у мишей зі збереженою мікрофлорою кишківника (тварини перебували у звичайних умовах і на стандартному раціоні). Як показано в табл. 8.1, у білих мишей, які протягом дослідження отримували гелеву форму бентоніту, спостерігалось зростання швидкості елімінації вірусів поліомієліту 1 типу. Такі тварини виділяли вірус протягом 8 діб (титр вірусу на 8 добу дорівнював $1,25 \pm 0,12 -\log \text{ТЦД}_{50}/50$ мкл), натомість у тварин контрольної групи елімінація вірусу тривала протягом 14 діб (титр вірусу на 14 добу становив $1,0 \pm 0,21 -\log \text{ТЦД}_{50}/50$ мкл), $P \leq 0,05$ [341]. Контрольною групою були тварини, яким інюкульовано вірус поліомієліту 1 типу без використання сорбентів.

Після перорального отримання тваринами гідрогелю метилкремнієвої кислоти зафіксовано також зниження тривалості виділення ентеровірусів. У таких тварин тривалість елімінації вірусу становила 11 діб (титр вірусу на 11 добу дорівнював $1,25 \pm 0,25 -\log \text{ТЦД}_{50}/50$ мкл), що на 3 доби менше, у порівнянні з контролем, $P \leq 0,05$, (табл. 8.1). Таким чином, аналіз інфекційних титрів вірусів, виділених з фекальних мас різних груп тварин, свідчить про те,

що використання сорбентів сприяє зниженню тривалості виділення вірусів поліомієліту у тварин з непорушеним мікробіоценозом кишківника [320].

Таблиця 8.1

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 ₅₀ /100 мкл)	Титр вірусу у виділеннях тварин, що отримували сорбенти (-log ТЦД ₅₀ /100 мкл)	
		Гелеву форму бентоніту	Гідрогель метилкремнієвої кислоти
2	3,0±0,21	3,0±0,13 (P ₁ >0,05)	2,75±0,14 (P ₂ >0,05)
3	2,75±0,23	2,5±0,2 (P ₁ >0,05)	2,5±0,14 (P ₂ >0,05)
4	2,75±0,23	2,5±0,14 (P ₁ >0,05)	2,5±0,2 (P ₂ >0,05)
5	2,5±0,2	2,0±0,13 (P ₁ >0,05)	2,5±0,2 (P ₂ >0,05)
6	2,5±2,75	1,5±0,14 (P ₁ <0,05)	2,0±0,3 (P ₂ >0,05)
7	2,5±0,25	1,25±0,13 (P ₁ <0,05)	2,5±0,28 (P ₂ >0,05)
8	2,25±0,13	1,25±0,12 (P ₁ <0,05)	1,5±0,4 (P ₂ >0,05)
9	2,0±0,13	-	1,5±0,25 (P ₂ >0,05)
10	2,0±0,29	-	1,0±0,25 (P ₂ >0,05)
11	1,25±0,14	-	1,0±0,25 (P ₂ >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;

P₁ – достовірність різниці титрів вірусів у мишей які отримували бентоніт в порівнянні з показниками мишей які знаходились на звичайному харчуванні. P₂ – достовірність різниці титрів вірусів у мишей які отримували гідрогель метилкремнієвої кислоти в порівнянні з показниками мишей які знаходились на звичайному харчуванні.

Дослідження впливу сорбентів на швидкість елімінації вірусів поліомієліту у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом показали також зростання даного показнику після використання обох препаратів (рис. 8.1) [341]. Так, тварини контрольної групи (тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом кишківника) виділяли вірус поліомієліту протягом 8 днів (титр вірусу на восьму добу становив $1,0 \pm 0,25$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл), натомість в групах тварин, які на фоні дисбіотичних порушень отримували ентеросорбент бентоніт, вона становила 5 днів (на п'яту добу титр вірусів складав $1,25 \pm 0,12$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл), $P \leq 0,05$, а тварин, які отримували ГГМКК - 6 днів (на шосту добу титр вірусів становив $1,0 \pm 0,21$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл), $P \leq 0,05$.

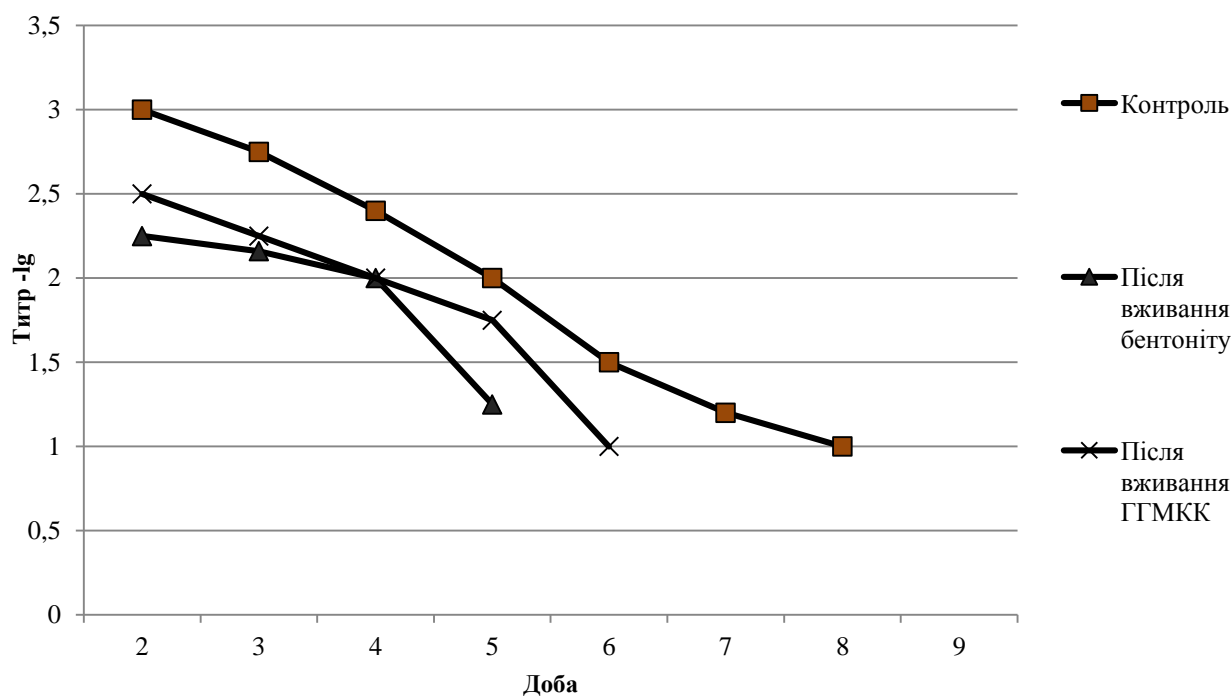


Рис. 8.1. Вплив сорбентів на тривалість виділення вірусів поліомієліту у мишей з антибіотикоіндукованим дисбіозом.

Примітки: Контроль: тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом кишківника

В даному випадку важливим є не лише тривалість виділення ентеровірусів у тварин з штучно сформованим дисбіозом, але й показники інфекційних титрів вірусів, які виділяються тваринами у навколишнє середовище. Результати наших експериментальних досліджень доводять

здатність сорбентів знижувати концентрацію ентеровірусів у виділеннях у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом. На п'яту добу вживання тваринами гелевої форми бентоніту титр вірусів дорівнював $1,25 \pm 0,18$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл, в контрольній групі $2,0 \pm 0,1$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл ($P \leq 0,05$). Після вживання тваринами сорбенту на основі гідрогелю метилкремніевої кислоти, на 5 добу ці показники дорівнювали $1,75 \pm 0,14$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл та $2,0 \pm 0,1$ $-\log$ ТЦД₅₀/50 мкл відповідно ($P > 0,05$).

8.2 Дослідження антимікробних властивостей сорбентів

Оцінка ефективності використання ентеросорбентів для регуляції мікробіоценозу кишківника з урахування вірусного фактору вимагає дослідження їх впливу на бактеріальний компонент мікробіоти. Антимікробну активність досліджуваних препаратів вивчали за стандартним методом дифузії препарату в агар [257]. Для вирощування мікроорганізмів обирались відповідно стандартизовані поживні середовища. Поверхневий посів «газоном» проводили з використанням суспензій мікроорганізмів із концентрацією 5×10^7 мікробних тіл в 1 мл. В середовищах робили лунки діаметром 6 мм і вносили в них препарати у нативному стані. Після 24-годинної інкубації в термостаті при 37°C вимірювали діаметри зон інгібіції росту тест-мікроорганізмів, що утворилися внаслідок дії препаратів.

В якості тест-культур використовували шість еталонних штамів мікроорганізмів: *Enterococcus faecalis* УКМ В-915, *Candida albicans* УКМ В-2681, *Escherichia coli* УКМ В-906, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900, *Proteus vulgaris* УКМ В-905 та *Staphylococcus aureus* УКМ В-918. *S. aureus* належить до високопріоритетних збудників інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги, які, за даними ВОЗ, потребують посиленої уваги в розробці ефективних шляхів боротьби з ними [74]. З перерахованих видів добових культур мікроорганізмів за допомогою фізіологічного розчину готували

суспензії, що містили 5×10^7 мікробних клітин в 1 мл по стандарту мутності, які далі розводили, відповідно до завдань та методики досліджень.

Результати досліджень показали відсутність антимікробної дії у гідрогелю метилкремнієвої кислоти та монтморилоніту бентоніту при використанні методу дифузії препарату в агар (табл. 8.2).

Таблиця 8.2

Зони інгібіції росту тест-культур після взаємодії з сорбентами (мм)

Препарат	Тест – мікроорганізми					
	Грампозитивні			Грамнегативні		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>
Гідрогель метилкремнієвої кислоти	-	-	-	-	-	-
Бентоніт	-	-	-	-	-	-

З метою дослідження динаміки формування антимікробної активності гідрогелю метилкремнієвої кислоти та бентоніту, препарати зважували по 50 мг, для цього використовували аналітичні ваги, змішували з суспензією еталонних штамів мікроорганізмів, які містили 2×10^6 мікробних клітин в мл. Суміші витримували при кімнатній температурі і через 1, 3, 6 та 24 год висівали надосадову рідину в об'ємі 50 мкл на відповідні тверді поживні середовища. Через 24 год на такі ж середовища висівали і осад (сорбент). В якості контролю використовували вихідні мікробні зависі без сорбентів.

Антимікробну активність у ГГМКК виявлено через 6 год після його взаємодії зі *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa*, після взаємодії з усіма іншими тест-мікроорганізмами – значно пізніше, після 24 год. Бактерицидна дія у

даного сорбенту зафіксована лише по відношенню до *Enterococcus faecalis* УКМ В-915 після їх контакту протягом доби. У бентоніту така властивість відносно досліджуваних мікроорганізмів протягом 24 год спостереження не зареєстрована, хоча через 24 год контакту з ним відмічали незначне зменшення кількості колоній таких мікроорганізмів як *P. aeruginosa* УКМ В-900 та *E. coli* УКМ В-906 (табл. 8.3).

Таблиця 8.3

Динаміка прояву антимікробної активності ГГМКК та бентоніту

Тест-мікроорганізми	Дослід	Час прояву антимікробної активності			
		ГГМКК		Бентоніт	
		10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷
<i>S. aureus</i>	П	6	>6	-	-
	Б	>24	>24	-	-
<i>Enteroc. faecalis</i>	П	6	24	-	-
	Б	24	24	-	-
<i>Candida albicans</i>	П	24	>24	-	-
	Б	>24	>24	-	-
<i>E. coli</i>	П	6	6	24	24
	Б	>24	>24	>24	>24
<i>P. aeruginosa</i>	П	6	6	24	24-
	Б	24	>24	>24	>24
<i>Proteus vulgaris</i>	П	24	>24	-	-
	Б	>24	>24	-	-

Примітки: П – час (год) контакту препаратів з мікроорганізмами, коли починає проявлятися антимікробна активність (зменшується кількість колоній). Б – час (год) контакту, при якому реєструється бактерицидна дія.

Сорбційні властивості вказаних препаратів вивчали також за допомогою електронно-мікроскопічних методів. В роботі використовували суспензії *S.*

aureus УКМ В-918 та *E. coli* УКМ В-906 в концентрації 10^8 мікробних клітин на 1 мл. До 1 мл суспензій мікроорганізмів у вищезазначених концентраціях додавали 50 мг кожного сорбенту та струшували протягом 2 хв. Електронно-мікроскопічне дослідження взаємодії мікроорганізмів з препаратами проводили через 15 хв, 60 хв, 6 год, 9 год та 12 год після їх контакту з бактеріями при кімнатній температурі. Для цього в зазначені вище періоди часу відбирали зразки, поміщали їх на плівки та здійснювали напилення хромом на обертальному столику вакуумного універсального посту (ВУП-5).

Результати електронно-мікроскопічного дослідження показали наявність сорбційної активності відносно кишкової палички у обох досліджуваних препаратів (рис. 8.2-8.5).

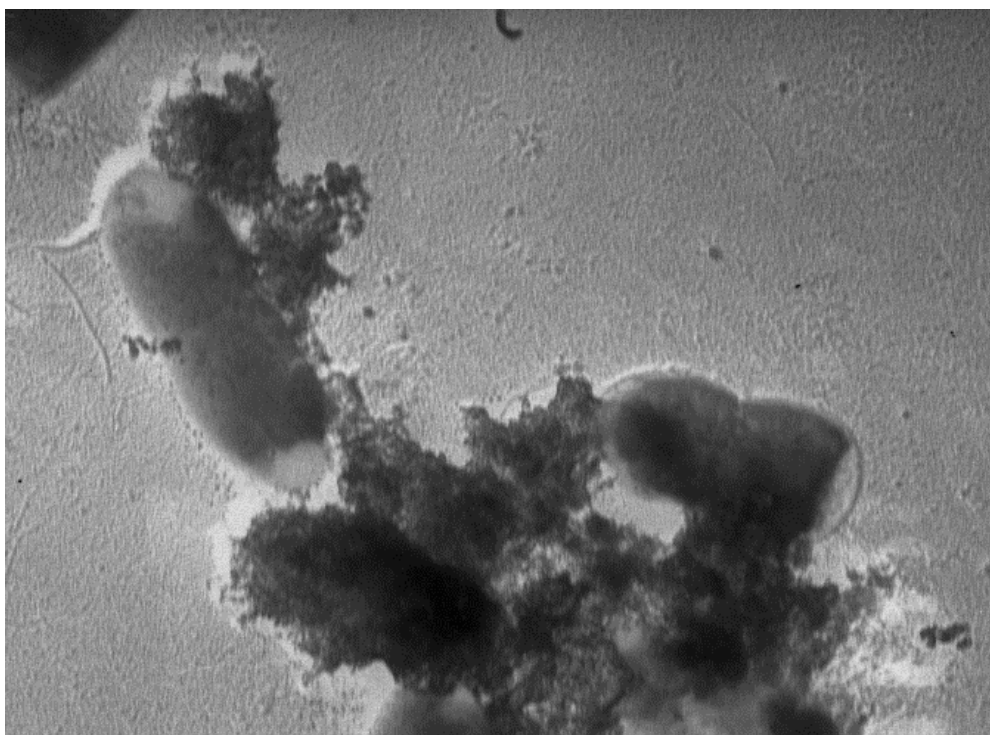


Рис. 8.2. Електронна мікроскопія. *E. coli* УКМ В-906 після 60 хв контакту з ГГМКК. Збільшення 20 000×.

Разом з тим, зв'язування *E. coli* УКМ В-906 гідрогелем метилкремнієвої кислоти відмічалась значно швидше ніж гелевою формою бентоніту – вже після 60 хв контакту з ГГМКК 50% бактеріальних клітин були сорбовані даним препаратом (рис. 8.2). У бентоніту такі властивості розпочинали проявлятися лише після 6 годин контакту (рис. 8.3). Сорбцію стафілококів на поверхні гідрогелю метилкремнієвої кислоти починали спостерігати через три години, а після 6 годин контакту більшість клітин *S. aureus* УКМ В-918 були зв'язані з ним (рис. 8.4).



Рис. 8.3. Електронна мікроскопія. *E. coli* УКМ В-906 після 6 год контакту з гелевою формою бентоніту. Збільшення 20 000×.

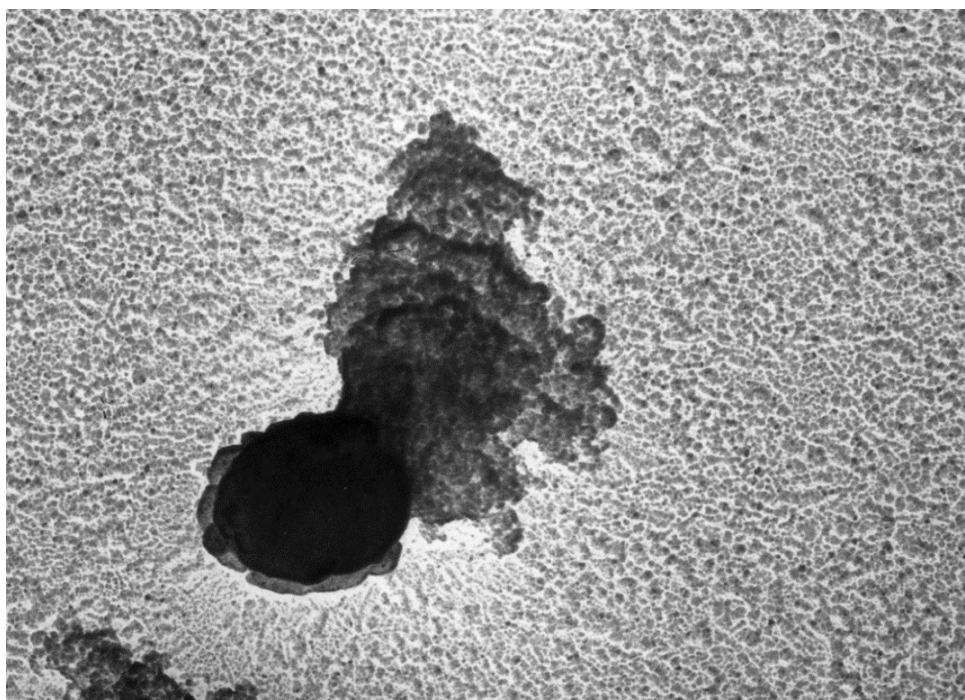


Рис. 8.4. Електронна мікроскопія. *S. aureus* УКМ В-918 після 6 год контакту з ГГМКК. Збільшення 20 000×.

Сорбційні властивості бентоніту відносно стафілококу зареєстровані лише на 6 годину взаємодії (рис. 8.5). Після 9 год контакту з бентонітом даних бактерій, вільних від сорбенту, практично не зустрічалось.



Рис. 8.5. Електронна мікроскопія. *S. aureus* УКМ В-918 після 9 год взаємодії з гелевою формою бентоніту Збільшення 20 000×.

Для дослідження показників сорбційної здатності бентоніту та гідрогелю метилкремнієвої кислоти стосовно вказаних вище штамів тест-мікроорганізмів препарати зважували по 50 мг і додавали до них по 0,1 мл суспензій тест-культур, що містили 2×10^6 мікробних клітин в 1 мл, витримували 1 годину при 4°C , вносили у флакони з 10 мл фізіологічного розчину, струшували протягом 10 хвилин і центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв для отримання осаду. Надосадову рідину в об'ємі 0,05 мл висівали на щільні середовища, оптимальні для тест-культур, при необхідності розбавляючи її фізіологічним розчином. Для експериментів підбирали такі розведення центрифугатів мікроорганізмів, які при посіві на тверді поживні середовища дають можливість підрахувати кількість отриманих колоній. Контролем слугували суспензії мікроорганізмів, які готували і обробляли аналогічно дослідним. Після 24-годинної інкубації в термостаті при температурі 37°C підраховували кількість колоній, що вирости і, враховуючи коефіцієнт розведення, визначали загальну їх кількість в досліді та в контролі. Показники сорбції досліджуваних препаратів визначали за формулою: $A = K - O / K \times 100$, де K і O – кількість мікроорганізмів, що висіяні відповідно з дослідного та контрольного зразків.

Як показано на рис. 8.6, найбільш активно гідрогель метилкремнієвої кислоти зв'язував *P. vulgaris* УКМ В-905, і *S. aureus* УКМ В-918, 90% і 82% відповідно. 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.

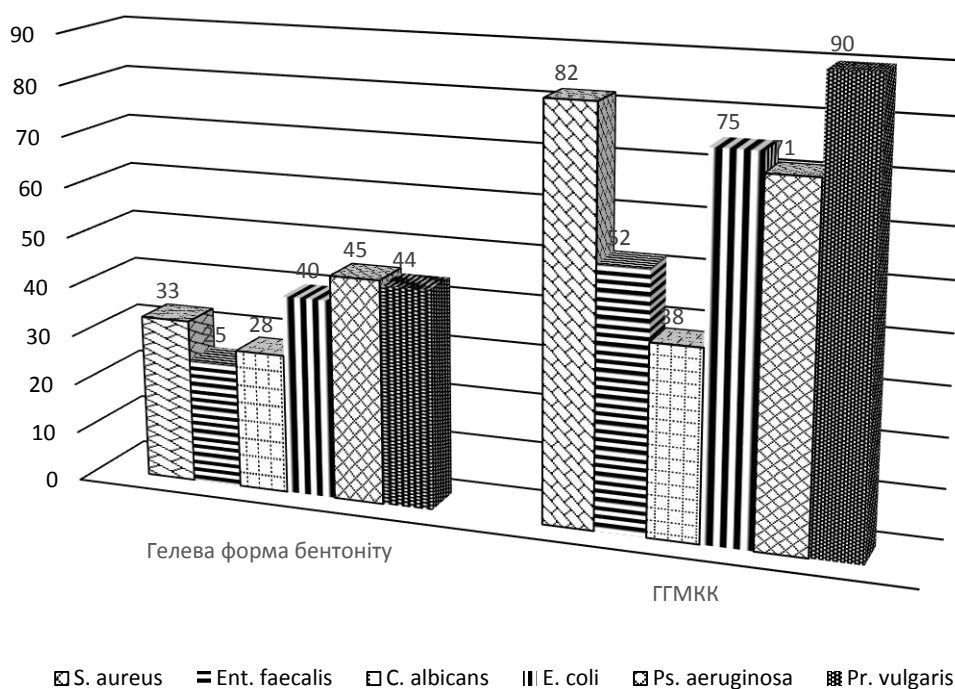


Рис. 8.6. Показники сорбційної здатності гідрогелю метилкремнієвої кислоти та гелевої форми бентоніту (%).

Сорбційна активність гелевої форми бентоніту щодо використаних в експерименті штамів мікроорганізмів була значно нижчою і коливалась в межах 27-45%. Експерименти також показали, що даний препарат зв'язує більш інтенсивно грамнегативні мікроорганізми. Натомість, відносно ентерококів цей показник не перевищував 25%.

Міцність зв'язку досліджуваних сорбентів і мікроорганізмів вивчали на прикладі *E. coli* УКМ В-906 та *S. aureus* УКМ В-918. Для цього після контакту бактерій з препаратами і центрифугування, як було описано вище, їх висівали з надосадової рідини на м'ясо-пептонний агар в об'ємі 0,02 мл. Надосадову рідину зливали, а до осадів додавали по 5 мл 0,85% розчину NaCl, 10% розчину NaCl, 50% сироватки та м'ясо-пептонний бульйону, які використовували в якості десорбентів. Струшували 10 хвилин та висівали в об'ємі 0,02 мл на м'ясо-пептонний агар. Після інкубації в термостаті при температурі +37°C протягом 24 годин підраховували кількість колоній бактерій, що виростили з

надосадових рідин і з елюатів та визначали показники елюції стафілококу та кишкової палички, сорбованих препаратами (табл. 8.4).

Отримані результати свідчать про те, що гідрогель метилкремнієвої кислоти наділений помірною міцністю зв'язку з *E. coli* УКМ В-906, з нього екстрагується від 5,73 до 8,3% бактерій. Найлегше даний сорбент «віддає» кишкову паличку при використанні в якості десорбенту 10% р-н NaCl, в даному випадку з нього звільнялось 8,3% мікроорганізмів, натомість, при використанні 0,85% р-н NaCl цей показник становив 3,92%. Відсоток десорбції *S. aureus* УКМ В-918 з ГГМКК був близьким до попередніх, в залежності від десорбенту він коливався в межах 1,6 – 4,46%. Найбільш ефективно елюція стафілококів відбувалась при використанні в якості десорбенту 0,85% р-н NaCl.

Порівняно з гідрогелем метилкремнієвої кислоти, бентоніт легше «віддавав» зв'язані з ним мікроорганізми. Показники ефективності десорбції *S. aureus* УКМ В-918 з бентонітом складала 6,8 – 16,2%. Найбільш ефективно десорбція даних мікроорганізмів з бентоніту здійснювалась при використанні в якості десорбенту МПБ та 50% сироватки ВРХ. За таких умов звільнялось 16,2% та 12,5 % стафілококів відповідно. Менш ефективними десорбентами виявились 20% розчин сахарози та 10% розчин NaCl, 8,8% та 6,8% відповідно, ще нижчі показники десорбції зафіксовані при його обробці 0,85% розчином NaCl, в даному випадку вони становили 6,8% (табл. 8.4). Міцність зв'язку бентоніту з *E. coli* УКМ В-906 є близькою до характеристики його сорбції зі *S. aureus* УКМ В-918, відсоток десорбції в залежності від десорбенту коливався у межах 7,25-12,3%. Найлегше даний процес відбувався у зразках, де екстрагентами слугували МПБ та 50 % сироватка ВРХ, в цьому випадку звільнялось 12,3 % та 9,2 % мікроорганізмів відповідно.

Таблиця 8.4

**Ефективність десорбції мікроорганізмів з гідрогелю
метилкремнієвої кислоти (ГГМКК) та бентоніту (%)**

Десорбент	Об'єкт дослідж.	ГГМКК		Бентоніт	
		Тест-мікроорганізми		Тест-мікроорганізми	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
0,85% р-н NaCl	A	7,5	4,9	6,9	5,8
	B	4,46	3,92	6,8	7,5
10% р-н NaCl	A	5	10,0	6	8,9
	B	2,73	8,3	6,8	8,2
20 % р-н сахарози	A	8,3	11,0	8,7	7,4
	B	1,6	5,39	8,8	7,25
50% сиров. ВРХ	A	4,3	10	5,2	8,4
	B	3,5	5,0	12,5	9,2
МПБ	A	5,5	10,5	4,25	8,5
	B	3,15	5,73	16,2	12,3

Примітки: А – надосадова рідина після центрифугування; В – елюат;

Отже, результати експериментальних досліджень дозволили встановити, що такі сорбенти як бентоніт та гідрогель метилкремнієвої кислоти, які здатні активно сорбувати кишкові віруси, не наділені вираженою бактерицидною функцією по відношенню до більшості видів досліджених мікроорганізмів бактеріальної природи. Разом з тим, при тривалому часі контакту, обидва сорбенти здатні зв'язувати бактерії. В більшій мірі такі властивості виражені у гідрогелю метилкремнієвої кислоти який, в залежності від виду мікроорганізмів, може сорбувати від 52 до 90% клітин. Показники сорбційної активності та міцність зв'язку мікроорганізмів з гелевою формою бентоніту були не такі виражені.

8.3 Дослідження впливу сорбентів на деякі фізіологічні показники лабораторних мишей

Оскільки 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, подальші дослідження стосувались аналізу зовнішнього вигляду, тривалості життя, та деяких інших функцій тварин, які постійно отримували в якості кормової добавки сорбент (гелеву форму бентоніту).

Об'єктами досліджень слугували білі лабораторні миші лінії *BALB/c*. Всього в досліді використано 110 мишей, що розведені у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Було проведено дві серії експериментів. У першій – задіяно 50 мишей (термін спостереження 2,5 роки), у другій – 60 (термін спостереження 2 роки). У ході кожного експерименту в дослідних та контрольних тварин визначали масу тіла, спостерігали за споживанням корму і води, за загальним станом, зміною координації рухів, станом шерсті, фіксували фертильність, зменшення поголів'я у дослідних та контрольних групах за рахунок смерті.

Впродовж усього періоду спостережень в дослідних групах тварин (60 мишей) при вживанні гелю бентоніту не відмічали прояву жодних клінічних симптомів гострої чи хронічної інтоксикації. Зовнішній вигляд тварин, їх поведінка, споживання корму та води не лише не відрізнялися від тварин контрольної групи, але й спостерігався деякий позитивний вплив гелю бентоніту на дослідні групи мишей. Тварини були більш активними, відмічався кращий стан шерстяного покриву. Крім цього, у мишей, які отримували бентоніт, спостерігався більш виражений приріст маси тіла, хоча він статистично не значно відрізнявся від контрольної групи тварин ($p < 0,05$) (рис. 8.7).

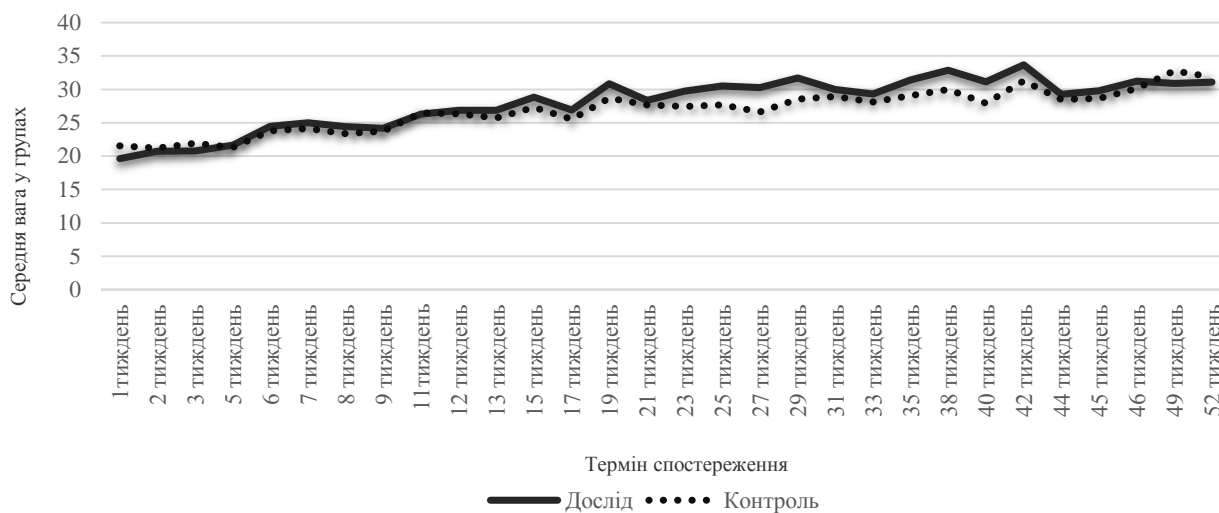


Рис. 8.7. Приріст маси тіла лабораторних тварин при річному спостереженні (дослід 1).

Пізніше, в процесі старіння мишей дана різниця нівелювалася, а в другому повторі досліді приріст маси дослідної групи не відрізнявся від контрольної (рис. 8.8).

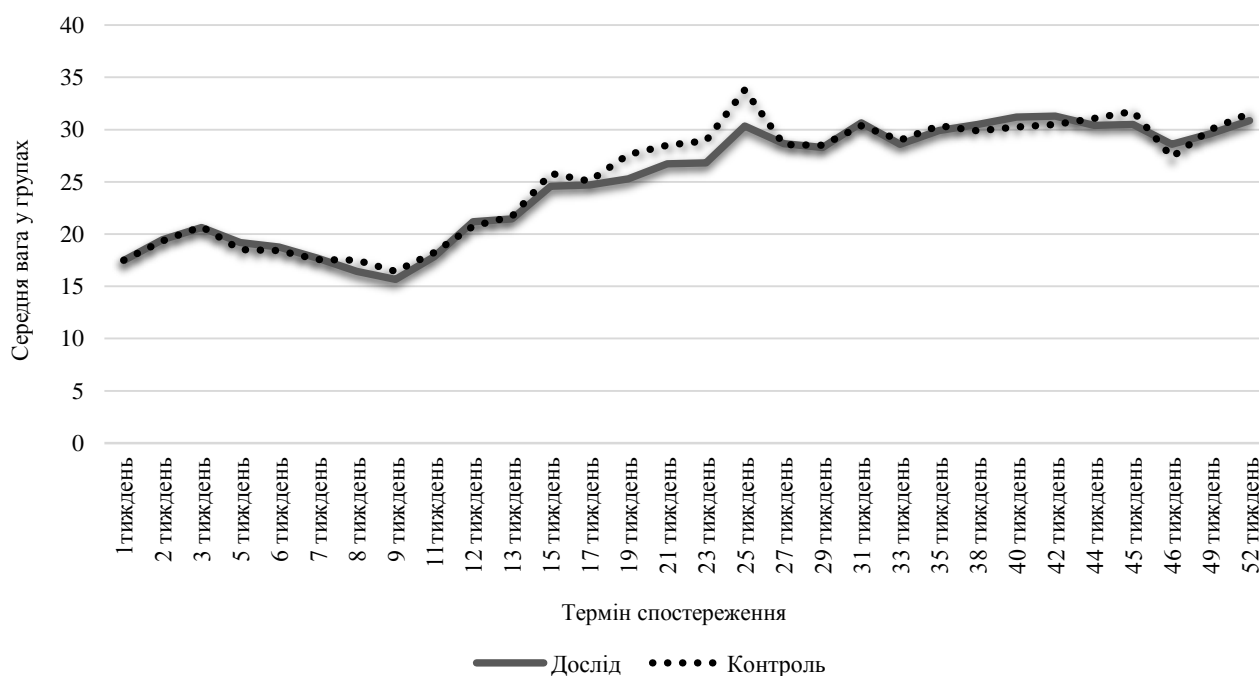


Рис. 8.8. Приріст маси тіла лабораторних тварин при річному спостереженні (дослід 2).

На основі цього можна зробити висновок, що постійне вживання гелю бентоніту не призводило до надмірного збільшення ваги у тварин і не має розглядатися як можливий чинник у розвитку абдомінального ожиріння. У продовж всього періоду спостереження смертність серед тварин контрольної групи була вищою, ніж дослідної групи [342]. У першому експерименті дана різниця становила від 3,7 % до 19,7 %. У повторному досліді – від 10 % до 23,4 % (табл. 8.5).

Таблиця 8.5

Смертність серед тварин при дворічному спостереженні

№ з/п	Термін спостереження, місяців	Смертність тварин, %, $p > 0,05$			
		Перша серія експерименту ($p \leq 0,05$)		Друга серія експерименту ($p \leq 0,05$)	
		Контрольна група	Дослідна група	Контрольна група	Дослідна група
1	3	10	3,5	46,6	26,7
2	6	20	3,5	46,6	26,7
3	9	30	10,3	46,6	33,3
4	12	30	10,3	46,6	33,3
5	15	45	27,5	46,6	33,3
6	18	75	58,6	60,0	43,3
7	21	80	68,9	76,7	53,3
8	24	90	86,2	80,0	70,0

Наступним критерієм, за яким оцінювали вплив гелю бентоніту на лабораторні тварини, було дослідження фертильної функції. Даний критерій оцінювали за кількістю потомства у дослідній та контрольній групі. У першому та другому досліді кількість новонароджених мишей в тварин, що вживали бентоніт, була більшою у порівнянні із контрольною групою., що

свідчить про позитивний вплив бентоніту на репродуктивну активність лабораторних тварин (рис. 8.9).

В контрольній групі першої серії експерименту незначна кількість приплоду пояснюється тим, що в даному досліді стани вагітності самок частіше завершувалися поїданням приплоду. Слід також зауважити, що внаслідок канібалізму, що часто спостерігається у гризунів, показники народжуваності значно менші від реальних не тільки у контрольних, а також у дослідних групах обох серій експерименту.

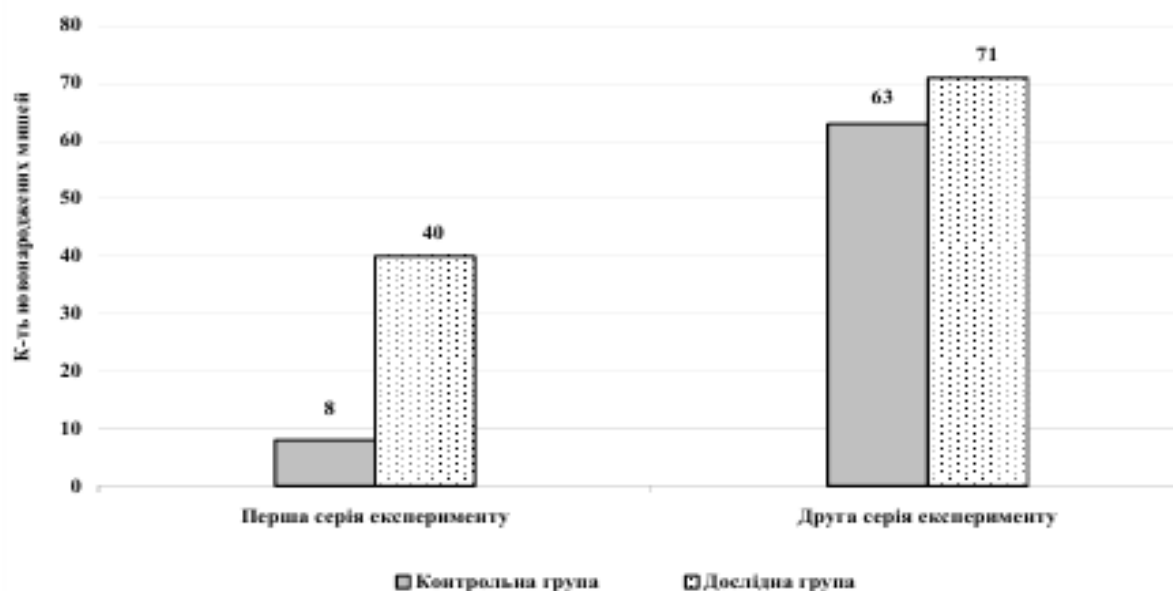


Рис. 8.9. Характеристика репродуктивної функції дослідних тварин

Для пояснення ефекту підвищення плідності мишей при вживанні гелю бентоніту потрібні додаткові дослідження. Одним із вірогідних факторів може бути оздоровлення мікробіому та збагачення організм мишей окремими есенціальними мінеральними елементами (кремнієм та ін.), що впливає на безліч фізіологічних функцій, у тому числі і на репродуктивність.

Таким чином, використання гелевої форми бентоніту має в цілому позитивний вплив на організм дослідних тварин (білі лабораторні миші лінії *BALB/c*), що виражалось у значному зменшенні їх смертності та позитивному впливу на фертильні функції.

Висновки до розділу 8.

Вдосконалений спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей дозволив підвищити його сорбційні властивості, в тому числі щодо ентеровірусів, вологоутримуючу здатність, а також ступінь очищення та диспергування. Використання такого сорбенту шляхом перорального вживання дозволило отримати зниження тривалості виділення вірусів поліомієліту у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом. Дещо меншою мірою такі висновки можна зробити і про сорбент на основі гідрогелю метилкремнієвої кислоти. Експериментально обґрунтовано здатність гелевої форми бентоніту сприяти зниженню інфекційної активності вірусів у тварин з порушенням складу мікробіому кишківника при його використанні в комбінації з антибактеріальними препаратами, що відкриває перспективи для розробки ефективних комплексних методів лікування хворих з вірусними інфекціями.

Вивчено антимікробні і сорбційні властивості препаратів бентоніту і гідрогелю метилкремнієвої кислоти та показано їх здатність зв'язувати бактерії при тривалому контакті. В більшій мірі такі властивості виражені у гідрогелю метилкремнієвої кислоти який, в залежності від виду мікроорганізмів, може сорбувати від 52 до 90% клітин.

Крім того, показано, що використання гелевої форми бентоніту, як кормової добавки, має в цілому позитивний вплив на організм лабораторних тварин (білі миші лінії *BALB/c*), який виражається у значному зменшенні їх смертності та позитивному впливі на фертильні функції.

Основні положення, викладені у розділі 8 опубліковані у наступних наукових працях:

1. 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.

2. 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.

3. Nahaichuk, V. I., Nazarchuk, O. A., Babina, Y. M., Osadchuk, N. I., Bobyr, V. V., Dmytriiev, D. V., Palii, D. V., Makats, Y. F., & Chornopyshchuk, R. M. (2020). Analytic prognostication of sensitivity to fluoroquinolones in *S. aureus*, as pathogens of infectious complications in burn patients. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 24(1), 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).

4. 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.

РОЗДІЛ 9

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ ПРОБІОТИКІВ ТА СОРБЕНТІВ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ПРИ ДИСБІОЗИ КИШКІВНИКА

Результати досліджень, описані вище, свідчать про важливе значення вірусного компонента в структурі дисбіозу та вказують на необхідність розробки ефективних методів корекції мікробіоценозу кишківника на фоні вірусних інфекцій. Основними препаратами, які для цього використовують, залишаються пробіотики, проте, викладені в попередніх розділах дані про здатність сорбентів знижувати тривалість виділення та концентрацію ентеровірусів у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом, визначили необхідність, поряд з пробіотичними препаратами, вивчити також ефективність використання й ентеросорбентів з позиції профілактики ними структурно-морфологічних порушень у кишківнику тварин.

Сьогодні найбільш поширеним методом оцінки ефективності пробіотиків та сорбентів при дисбіозі залишається мікробіологічний метод. Разом з тим, на нашу думку, він не дозволяє в повній мірі провести аналіз дії цих препаратів на макроорганізм без вивчення ультраструктурних змін у внутрішніх органах тварин, що відбуваються при таких порушеннях.

9.1 Використання пробіотиків та сорбентів для профілактики структурно-морфологічних порушень в кишківнику тварин з дисбіозом

Дослідження проводилось у два етапи: спочатку вивчали роль сорбентів та пробіотиків в профілактиці структурних порушень у внутрішніх органах тварин, які розвиваються при дисбіозі, далі – їх роль в профілактиці порушень структур у внутрішніх органах, що формуються при дисбіозі в тварин, інфікованих ентеровірусами (віруси Коксакі В) та вірусно-бактеріальними інфекціями (віруси Коксакі В та *Salmonella typhimurium*).

Моделлю для вивчення морффункціональних змін слизової тонкого кишківника при дисбіозі, індукованого антибіотиками, та після їх корекції пробіотиками і ентеросорбентами обрано білих лабораторних мишей лінії *BALB/c*. Формування у тварин дисбіотичних станів проводили за описаною раніше методикою [229]. Крім того, зазначені антибіотики додавали в поїлку з водою (по 1 г ампіциліну, 1 г метронідазолу та 290 мг гентаміцину на 1000 мл води). Всього в досліді задіяно 80 мишей. Перша група – контрольна, сформована з інтактних тварин, складала 20 особин; 2 група – тварини зі сформованим дисбіозом кишківника; 3 група – тварини, які в процесі моделювання дисбіотичних станів перорально отримували мультипробіотик на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, «молочних» видів роду *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій роду *Acetobacter*.; 4 група – тварини, які протягом усього періоду моделювання дисбіозу перорально отримували гелеву форму сорбенту бентоніту. Тварин виводили з експерименту через 5 діб після початку моделювання дисбіозу. Пробіотики та сорбенти тваринам вводили внутрішньошлунково протягом 5 діб в об'ємі 200 мкл через 6 год після отримання антимікробних препаратів для формування дисбіозу.

В процесі моделювання дисбіотичних порушень у контрольній групі тварин зафіксований нормальний мікробіологічний фон (*E. coli* $7,6 \times 10^3$ – $4,2 \times 10^4$ КУО/г, *Lactobacillus spp.* $8,8 \times 10^6$ – $2,6 \times 10^7$ КУО/г, *Bifidobacterium spp.* $9,2 \times 10^7$ – $2,4 \times 10^8$ КУО/г). Водночас через 5 діб після початку введення антибіотиків у мишей виявлено зниження кількості усіх тестових мікроорганізмів на один-два порядки (рис. 10.1). В дослідній групі тварин, які отримували пробіотики, мікробіологічні показники теж змінились, але вони були не такі виражені, як у випадку використання лише антибіотиків, – *E. coli* $1,8 \times 10^3$ – $6,2 \times 10^3$ КУО/г, *Lactobacillus spp.* $7,4 \times 10^5$ – $3,6 \times 10^6$ КУО/г, *Bifidobacterium spp.* $8,2 \times 10^6$ – $3,0 \times 10^7$ КУО/г. Натомість у групі тварин, що одержували ентеросорбенти, зафіксовані більш виражені порушення мікробіоценозу кишківника: *E. coli* $4,2 \times 10^2$ – $9,3 \times 10^2$ КУО/г, *Lactobacillus*

spp $1,2 \times 10^5 - 3,0 \times 10^5$ КУО/г, *Bifidobacterium spp* $8,4 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$ КУО/г (рис. 10.1).

Дані, представлені на рис. 9.1, дозволяють зробити висновок про нормалізацію мікроекологічних порушень при спільному вживанні антибіотиків та пробіотиків. Разом з тим, після одночасного прийому тваринами антибіотиків з сорбентами (дослідна група 4) мікробіологічні показники за зазначеними видами тестових мікроорганізмів мало відрізнялись від групи тварин, в яких штучно були сформовані дисбіотичні розлади (дослідна група 2).

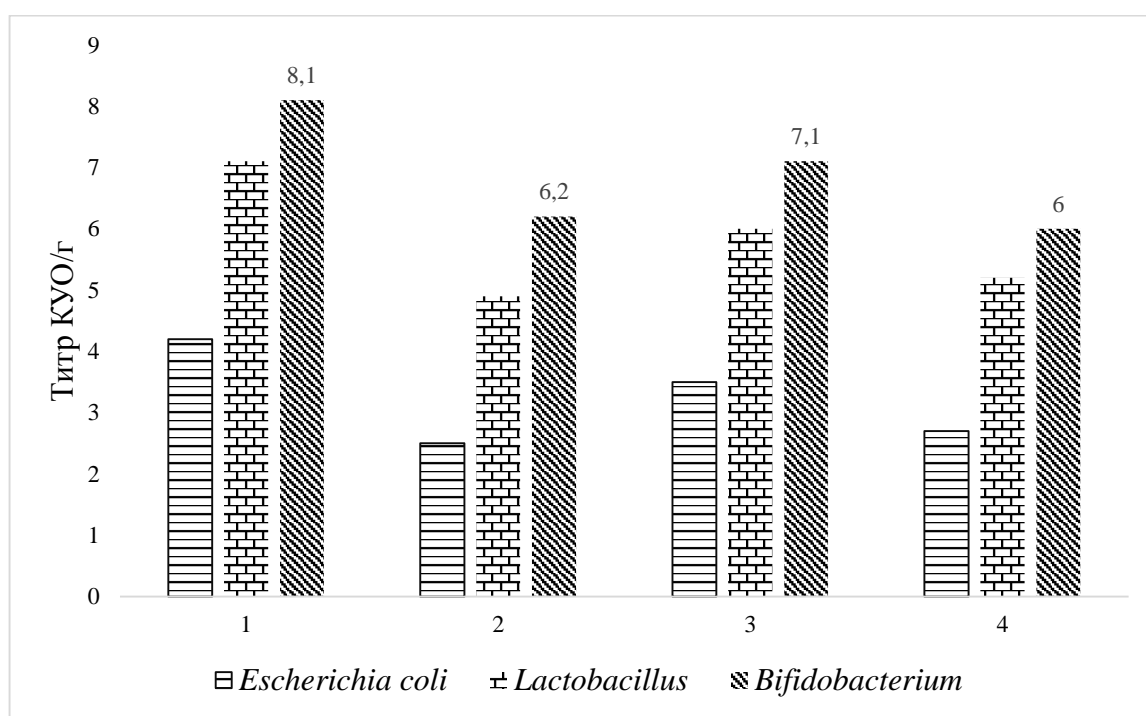
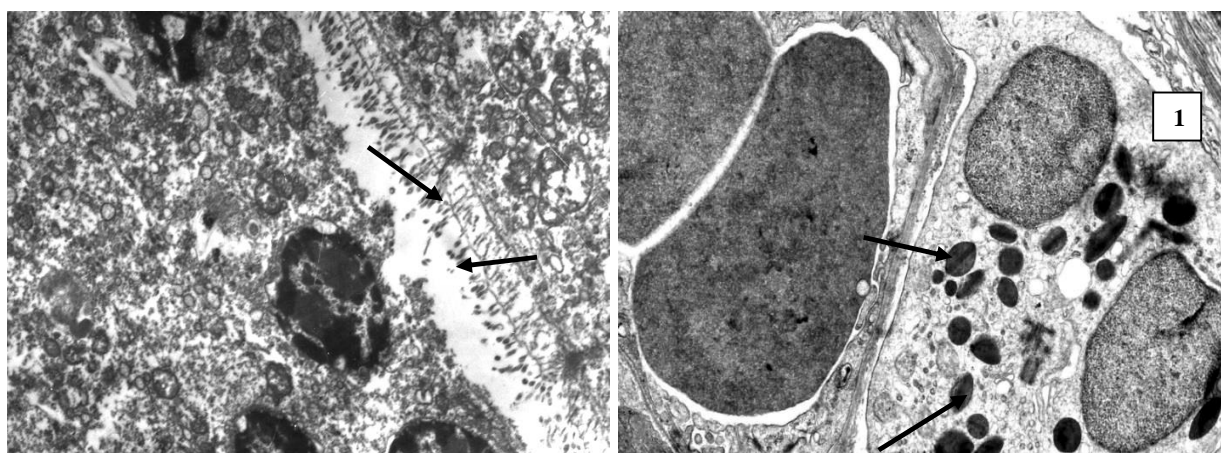


Рис. 9.1. Склад мікрофлори просвіту кишківника мишей в нормі (1), при антибіотикоіндукованому дисбіозі (2) після використання пробіотиків (3), після використання сорбентів (4).

В результаті аналізу структурно-морфологічних змін тонкого кишківника мишей з антибіотикоіндукованим дисбіозом (дослідна група 2) зафіксовано виражені порушення, що супроводжують даний процес і детально описані в розділі 7: укорочення довжини мікроросинок та часткова їх

редукція чи деструкція з подальшим розпадом, відсутність щіткової облямівки мікрворсинок, згладженість плазматичної мембрани, набряклість мітохондрій та наявність аутофагосом (рис. 9.2А), а також зростання кількості еозинофілів, які є показником алергічних реакцій, оскільки беруть безпосередню участь в захисних алергічних та анафілактичних реакціях організму (рис. 9.2Б).



А

Б

Рис. 9.2. Електронна мікрофотографія. А. Локальна редукція щіткової облямівки ентероцитів тонкого кишківника миші при антибіотикоіндукованому дисбіозі (↑). Збільшення 6200×; Б. Еозинофіл (1) з характерними видовженими гранулами з кристалоїдом (↑). Збільшення 8000×.

В слизовій оболонці тонкої кишки мишей після використання пробіотиків відмічалось візуальне згасання проявів цитодеструктивних порушень, а саме – зменшення кількості десквамованих мікрворсинок, переважна більшість ентероцитів зберігала щіткову облямівку, у порівнянні з дослідною групою тварин №2 (тварини з дисбіозом) (рис. 9.3). При цьому десквамація мікрворсинок мала локальний характер з частковою відсутністю щіткової облямівки та незначною згладжуваністю плазматичної мембрани.

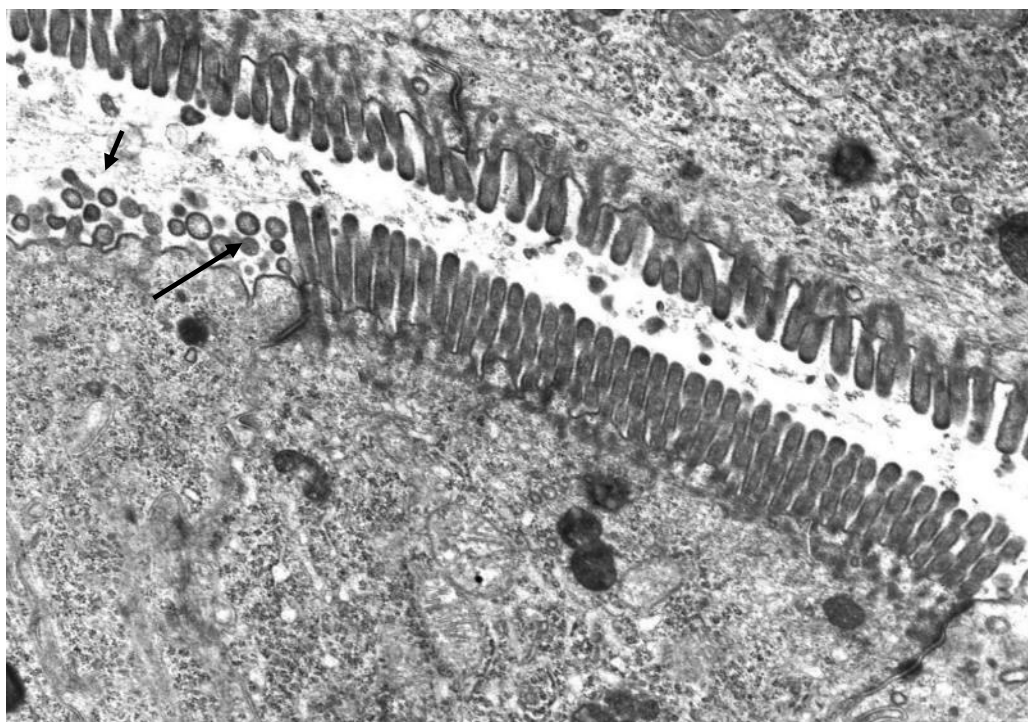


Рис. 9.3. Електронна мікрофотографія. Локальна десквамація мікрворсинок з частковою відсутністю щітчастої облямівки (↑) та незначною згладженістю плазматичної мембрани у тварин з дисбіозом після використання пробіотиків. Збільшення 8000×.

Слід також відмітити про інтенсивне утворення аутофагосом в ентероцитах після використання мультипробіотиків (рис. 9.4). Електронно-мікроскопічні дослідження продемонстрували відсутність ознак зміщення клітин до базальної мембрани, ущільнення цитоплазми, органел і попередників апоптозних тілець, а також інших апоптичних порушень. Слід відмітити, що у гранулах клітин Панета зафіксовані специфічні зміни: гранули, які, очевидно, містили дефензини, поступово втрачали свій вміст та трансформувалися у структури з електронно-прозорим обідком. Такі гранули можна розглядати як об'єкти, що знаходяться на різних етапах функціональної активності і, очевидно, являють собою білки (рис. 9.5).

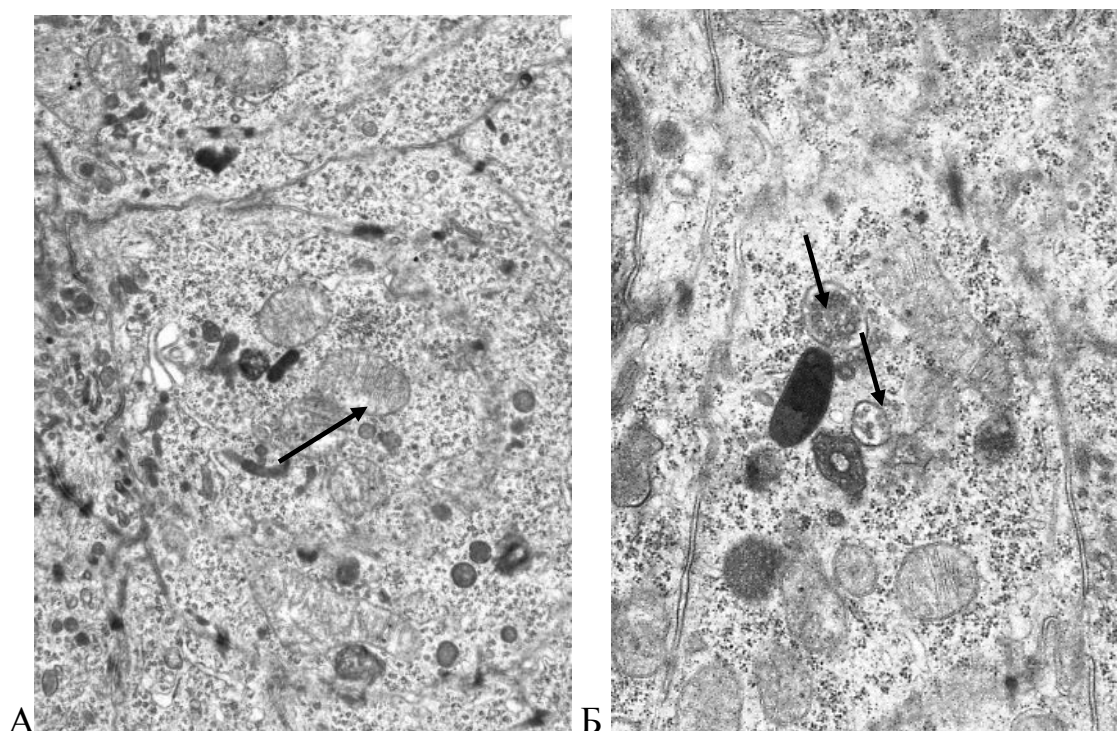


Рис. 9.4 – Електронна мікрофотографія. Набряклість мітохондрій (↑) (А) та інтенсивне утворення аутофагосом (↑) (Б) в ентероцитах на фоні використання пробіотиків. Збільшення 3600×.

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 ($12,6 \pm 2,4$ у тварин з дисбіозом та $5,4 \pm 1,15$ у тварин контрольної групи, $P < 0,05$, за результатами досліджень 30 квадратів кожного зі зразків).

На основі отриманих даних не можна стверджувати, що введені мишам пробіотичні штами колонізували кишківник. Разом з тим, не слід і виключати можливість пробіотиків активно виділяти метаболіти при проходженні через шлунково-кишковий тракт. Останні здатні позитивно впливати на бар'єрну функцію кишківника. Тим не менш, після використання пробіотиків в процесі

моделювання антибіотикоіндукованого дисбіозу мікроекологічні зміни та цитодеструктивні прояви в кишківнику тварин були менш виражені, у порівнянні з групою, де тварини отримували лише антибіотики.

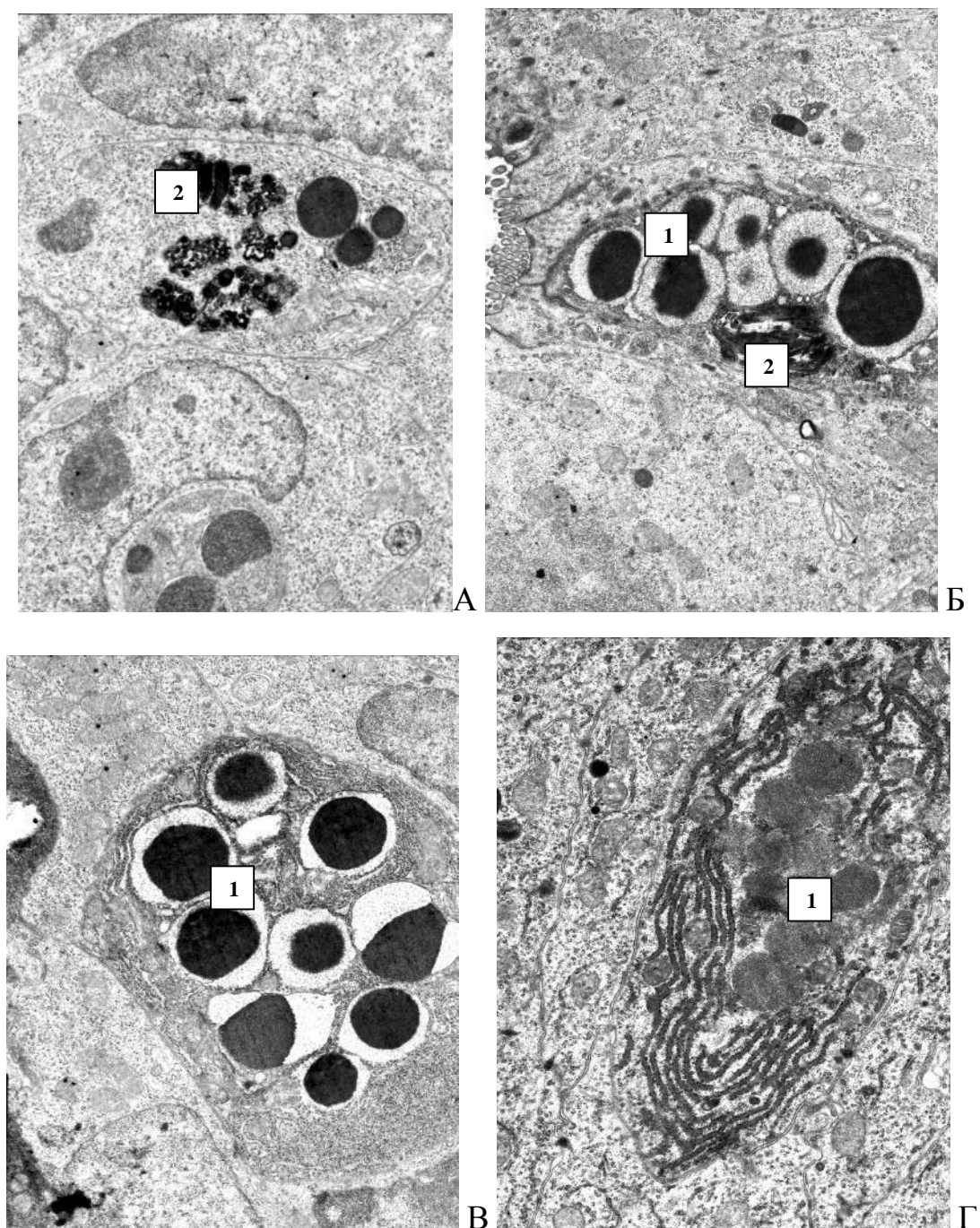


Рис. 9.5. Електронна мікрофотографія. Трансформація гранул клітин Панета (1) з утворенням цитосегреси (2). Збільшення 3600 \times .

В результаті ультраструктурного аналізу слизової оболонки тонкого кишківника мишей, формування дисбіозу у яких відбувалось на фоні вживання ентеросорбентів, встановлено зниження виразності структурних ушкоджень, у порівнянні з групою тварин, які отримували лише антибіотики. Хоча місцями у слизовій оболонці тонкого кишківника і спостерігали візуальне вкорочення довжини мікрворсинок, випадків повної їх десквамації або розпаду зафіксовано не було (рис. 9.6).

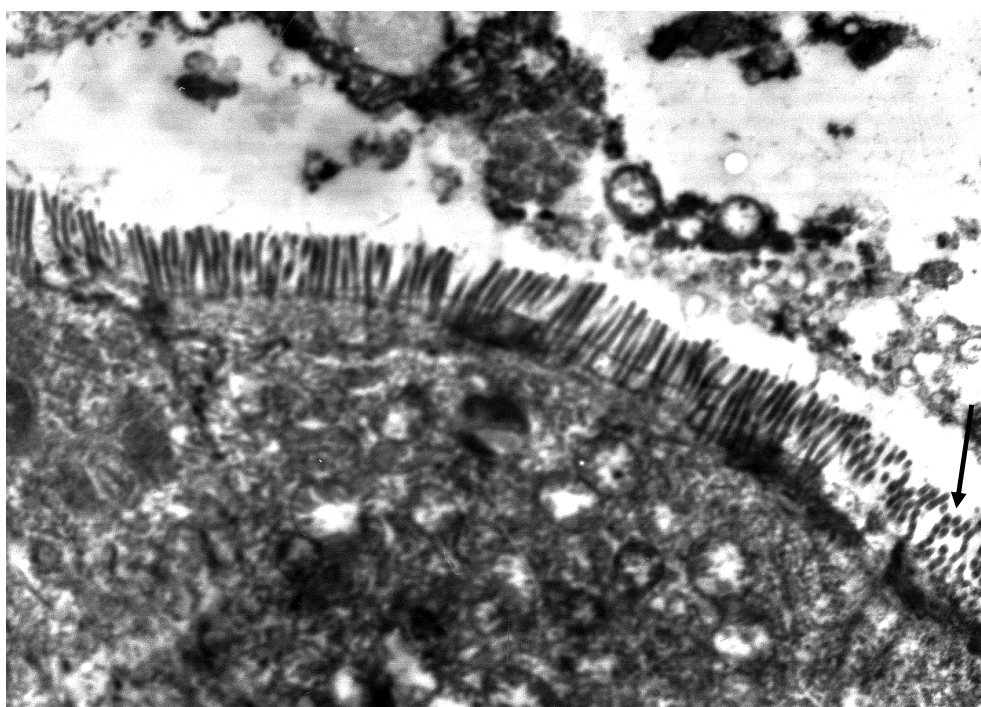


Рис. 9.6. Електронна мікрофотографія. Локальна десквамація мікрворсинок з частковою деструкцією мікрворсинок (↑) та не вираженою згладженістю плазматичної мембрани ентероцитів після використання гелевої форми бентоніту. Збільшення 8000×.

В цілому слід відмітити, що використання гелевої форми бентоніту для профілактики дисбіотичних розладів сприяє формуванню більш вираженої імунної відповіді, у порівнянні з пробіотичним препаратами. Після використання гелевої форми бентоніту зареєстровано активізацію плазматичних клітин, які можуть бути показником активності імунної

відповіді в цілому, про що свідчить виявлення плазматичних клітин з розширеними канальцями, заповнених, очевидно, антитілами (рис. 9.7).

Водночас з боку кровоносної системи змін також не відмічалось, і цілком ймовірно, що розвиток антибіотикоіндукованого дисбіозу не відображається на гемомікроциркуляторному руслі.

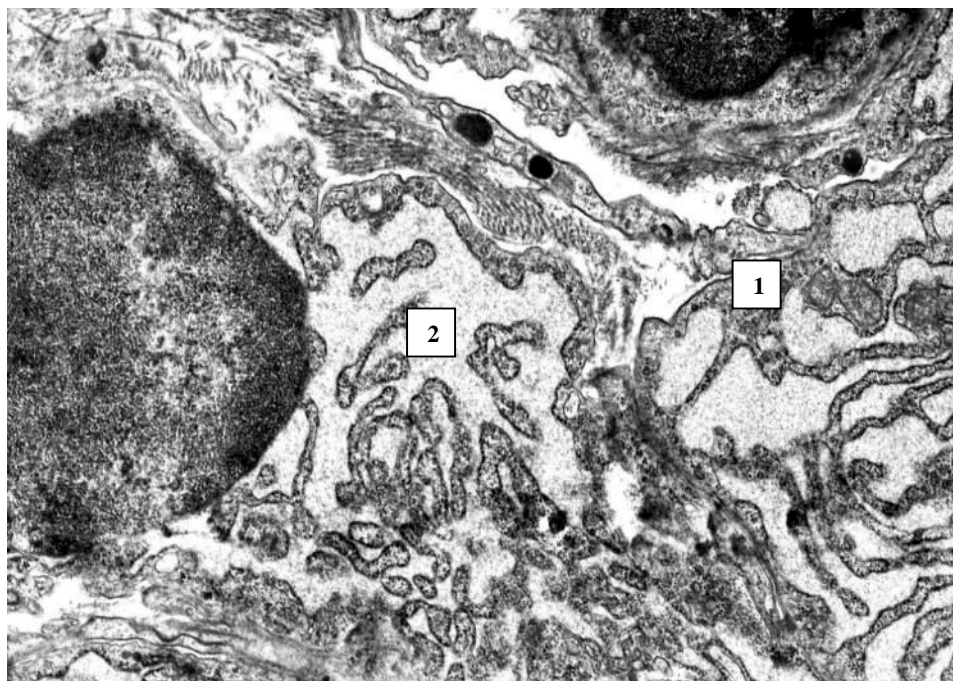


Рис. 9.7. Електронна мікрофотографія Плазматичні клітини (1) з розширеними канальцями (2). Збільшення 4200×.

Прямої ознаки, що вказували б на інтенсивний розвиток апоптозу з формуванням апоптозних тілець, які зміщуються до базальної мембрани, не відмічено. Інколи зустрічались передапоптозні клітини – на рис. 9.8 показано ущільнення ентероцитів.

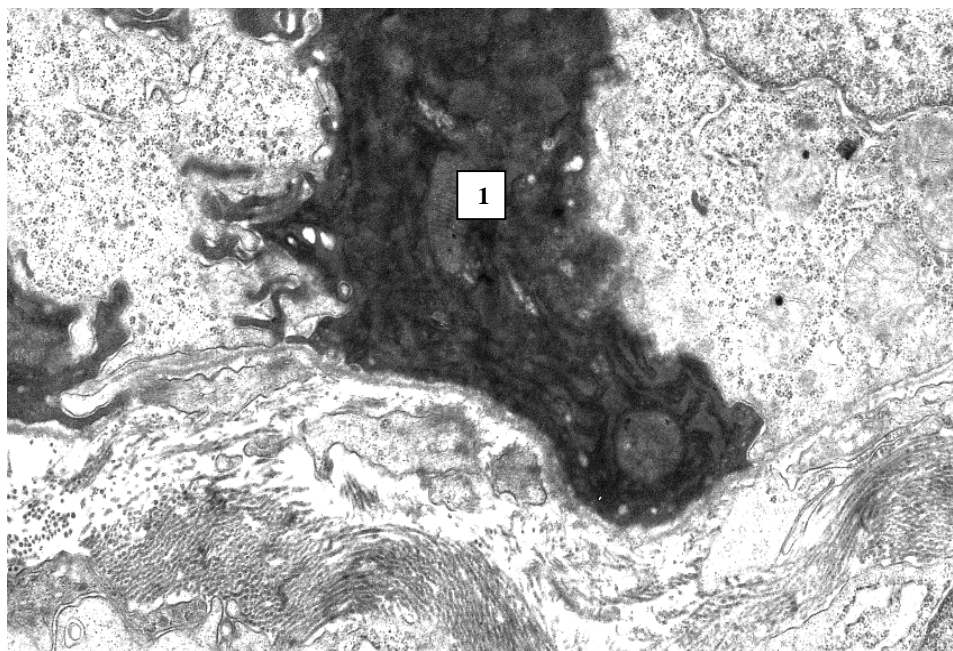


Рис. 9.8. Електронна мікрофотографія. Ущільнені ентероцити (1). Збільшення 6000×.

При отриманні електронно-мікроскопічних зрізів слизової оболонки тонкого кишківника зареєструвати мікробні клітини вдається не завжди, водночас після використання гелевої форми бентоніту в просвіті кишківника частіше відмічали їх присутність (рис. 9.9). Слід також відмітити про одиничні випадки присутності проєозинофілів і плазматичних клітин у власній пластинці слизової оболонки тонкої кишки.

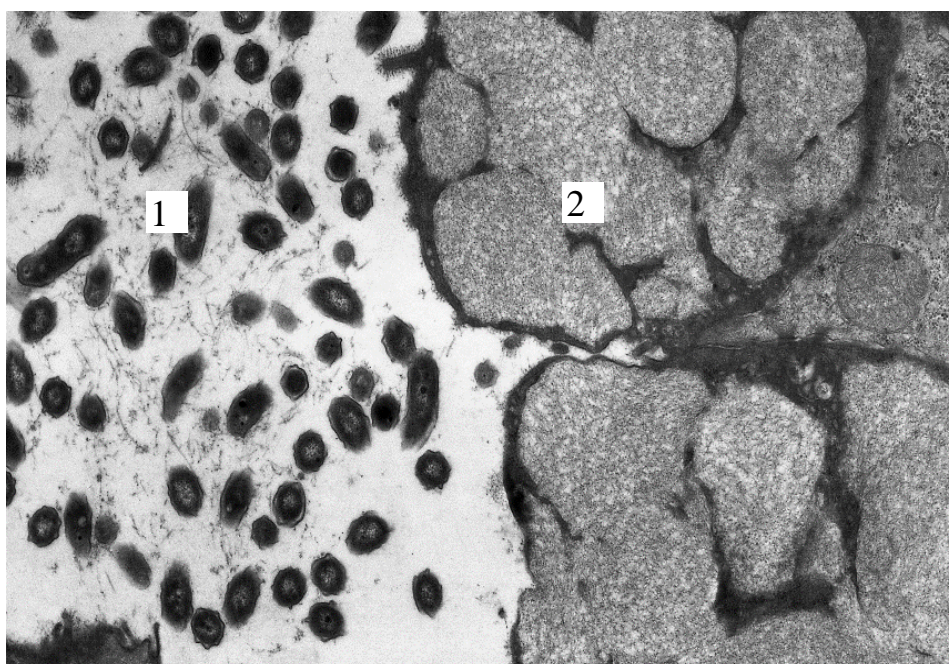


Рис. 9.9. Електронна мікрофотографія. Бактеріальні клітини в просвіті кишківника. Збільшення 6000×. 1 – мікробні клітини; 2 – келихоподібна клітина.

Отже, результати експериментів показали властивість обох досліджуваних груп препаратів сприяти зменшенню глибини цитодеструктивних змін в слизовій оболонці тонкого кишківника при формуванні антибіотикоіндукованого дисбіозу та нормалізацію імунних реакцій організму, які супроводжують розвиток таких порушень [343].

8.2 Роль сорбентів та пробіотиків у профілактиці морфологічних порушень у мишей з дисбіозом, інфікованих ентеровірусами та сальмонелами

Проведений раніше аналіз структурно-морфологічних порушень у внутрішніх органах тварин (тонкому кишківнику, печінці та селезінці), які розвиваються при дисбіотичних порушеннях на фоні вірусних та вірусно-бактеріальних інфекцій, дозволив виокремити вірусний фактор як ключовий елемент, що визначає глибину ультраструктурних порушень з вираженими

апоптозними змінами. Отримані результати спонукали до розробки алгоритмів, спрямованих на профілактику таких порушень у тварин, в першу чергу шляхом використання сорбентів та пробіотиків.

Схема експерименту. Всього в досліді використано 90 мишей, які були поділені на 3 групи (по 30 тварин у кожній групі). Моделювання дисбіотичних станів здійснювали відповідно до розробленої нами методики [229]. 1 група – тварини, формування дисбіозу в яких проводили одночасно з використанням , мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, «молочних» видів роду *Propionibacterium* та оцтовокислих бактерій роду *Acetobacter*, були інфіковані вірусом Коксакі В3, 2 група – тварини, формування дисбіозу в яких проводили одночасно з використанням ентеросорбенту на основі бентоніту, були інфіковані вірусом Коксакі В3, 3 група – контрольна. Мультипробіотики та ентеросорбенти тваринам вводили внутрішньошлунково в об'ємі 200 мкл через 6 год після отримання антимікробних препаратів. Термін спостереження за тваринами становив 21 добу. В якості тестових вірусів використано віруси Коксакі В3. Інфікували тварин вірусами внутрішньоочеревинно ($6,0 \log \text{ТЦД}_{50}/100 \text{ мкл}$).

Оскільки специфічні ультраструктурні зміни при дисбіотичних процесах на фоні Коксакі вірусної інфекції у мишей були зафіксовані лише в елементах кишківника, ефективність сорбентів та пробіотиків з позиції профілактики таких порушень вивчали на прикладі тонкого кишківника. Одержані результати показали, що у мишей після використання гелевої форми бентоніту незначно нормалізувалась ультраструктура кишківника – зменшилась кількість десквамованих мікроворсинок та згладженість плазматичної мембрани, спостерігали менш виражені дистрофічні зміни у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі кишківника з незначним набряком мітохондрій у клітинах. Разом з тим, як показано на рис. 9.10, в окремих ентероцитах розвивались апоптозні зміни зі зміщенням клітин до базальної мембрани, ущільненням цитоплазми і органел, а також формуванням передаптозних та апоптозних тілець.

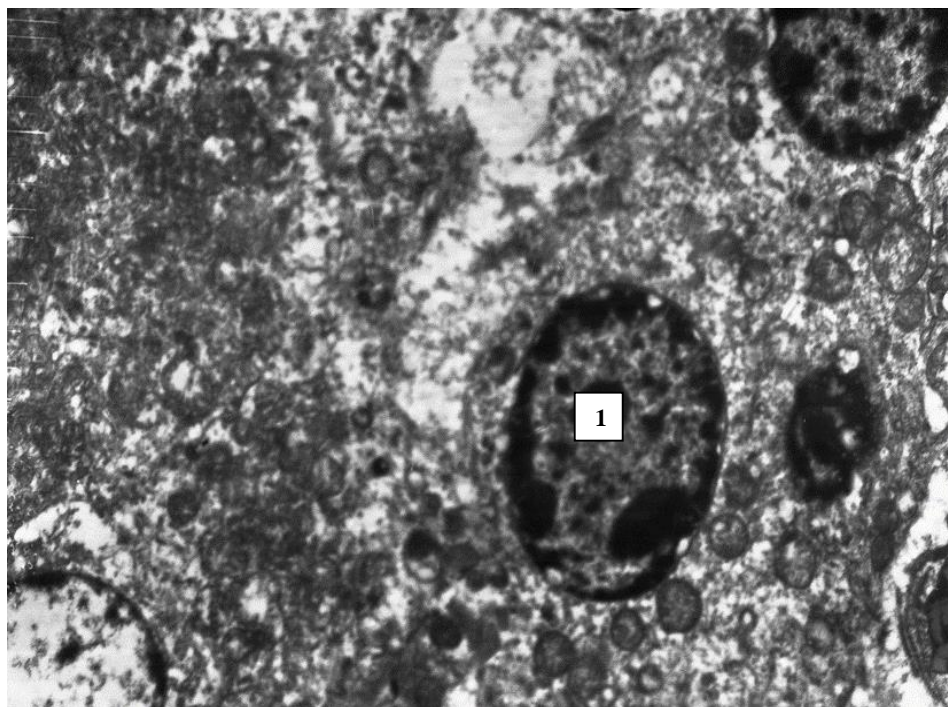


Рис. 9.10. Електронна мікрофотографія. Поодинокий апоптоз ентероцитів тонкої кишки у мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В, після використання гелевої форми бентоніту (1). Збільшення 8400×.

Профілактичне використання мультипробіотиків на основі біфідобактерії, лактобацил, лактококів, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій в процесі моделювання дисбіотичних станів у мишей, інфікованих вірусом Коксакі В3, дозволило отримати позитивні результати. Після аналізу електронограм апоптозних змін виявлено не було, лише спостерігали не значні ознаки дисбіозу з візуальним укороченням довжини мікрворсинок слизової і не вираженою згладженістю плазматичної мембрани ентероцитів. При цьому тотальної десквамації мікрворсинок з деструкцією і подальшим розпадом не зафіксовано, як і не було встановлено набрякості мітохондрій, вираженого просвітлення матриксу, розширення міжклітинних контактів та інших патоморфологічних ознак, притаманних дисбіозу (рис. 9.11).

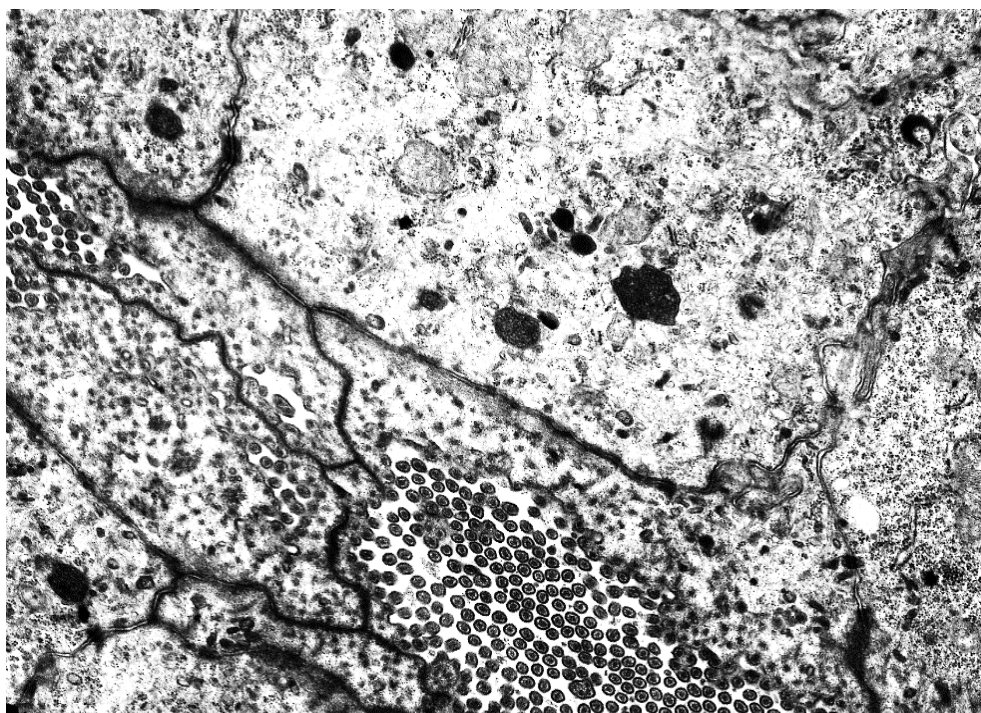


Рис. 9.11. Електронна мікрофотографія. Відсутність ознак апоптозу в кишківнику мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В, після використання мультипробіотиків. Збільшення 12800×.

Дані, отримані нами раніше, показали, що перебіг вірусно-бактеріальних інфекцій у тварин з дисбіозом часто супроводжується розвитком дегенеративних процесів у внутрішніх органах, а також розвитком некротичних змін у печінці, які можуть мати генералізований характер. З огляду на це, завданням наступного етапу було вивчення ефективності використання сорбентів і пробіотиків з метою профілактики ультраструктурних ушкоджень слизової оболонки кишківника у мишей з дисбіозом, інфікованих змішаною (Коксакі В та сальмонельозною) інфекцією.

Схема експерименту. Об'єктами досліджень слугували білі лабораторні миші лінії *BALB/c*. Всього використано 90 мишей, які були поділені на 3 групи (по 30 тварин у кожній). 1 група – тварини, формування дисбіозу в яких проводили одночасно з використанням мультипробіотиків на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter*,

були інфіковані Коксакі В3 та *Salmonella typhimurium*, 2 група – тварини, формування дисбіозу в яких проводили одночасно з використанням сорбенту бентоніту, були інфіковані Коксакі В3 та *Salmonella typhimurium*, 3 група – контрольна. Експериментальний сальмонельоз моделювали шляхом інфікування мишей патогенним штамом *Salmonella typhimurium*, виділеним та ідентифікованим в Київській міській клінічній лікарні №4 (клінічний ізолят №7683). Інфікування тварин бактеріями проводили внутрішньоочеревинно (в/о) в об'ємі 0,5 мл (1 млрд мікробних тіл) на одну особину. Пробіотики та ентеросорбенти тваринам вводили внутрішньошлунково в об'ємі 200 мкл через 6 год після введення антимікробних препаратів. Термін спостереження за тваринами становив 21 добу. Орієнтуючись на публікації, в яких йдеться про максимальний час накопичення збудників у відповідних органах і системах організму та тривалість їх циркуляції, тварин виводили з експерименту на третю добу після інфікування [327].

Аналіз мікрофотографій зрізів кишківника показав виражений профілактичний ефект пробіотичних препаратів, який проявляється зменшенням цитодеструктивних ознак дисбіозу в кишківнику тварин, інфікованих Коксакі В3 та *Salmonella typhimurium*, зокрема відсутністю тотальної десквамації мікроворсинок, згладженості плазматичної мембрани, набряку мітохондрій та формування аутофагосом. Не виявлено також апоптозних ядер та інших патоморфологічних ознак апоптозу, а також дистрофічних змін у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі кишківника. Відмічалась лише міграція нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів в інтерстицій кишківника, набряк інтерстиційного простору та посилена інфільтрація слизової оболонки макрофагами (рис. 9.12).

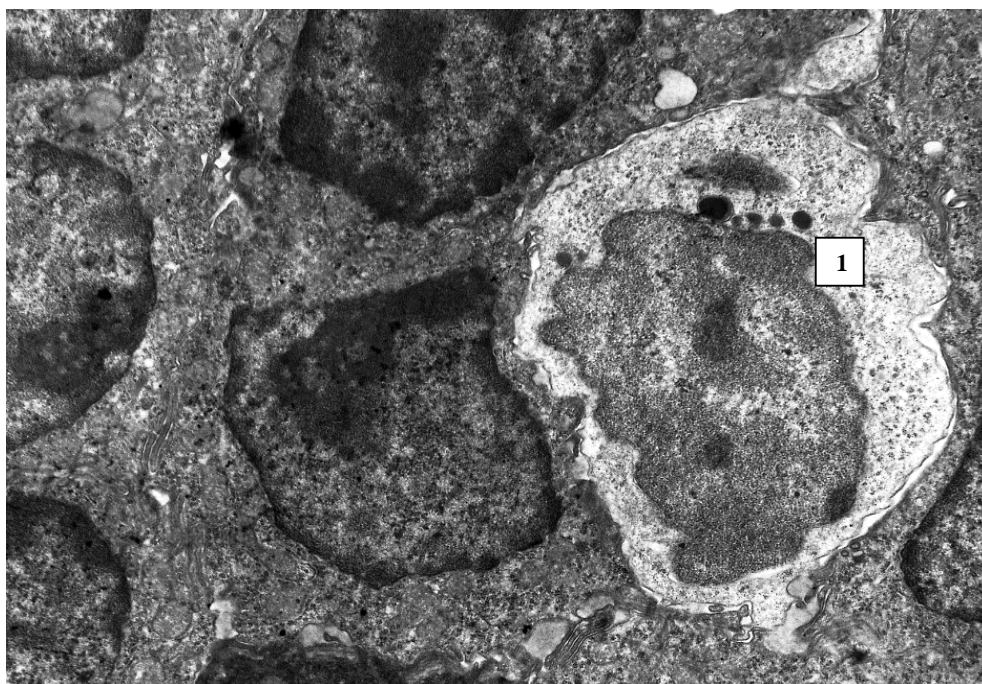


Рис. 9.12. Електронна мікрофотографія. Міграція лімфоцитів (1) в інтерстицій кишківника, набряк інтерстиційного простору після використання пробіотиків у тварин з дисбіозом, інфікованих Коксаکی В та *Salmonella typhimurium*. Збільшення 8000×.

Застосування пробіотиків в процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу суттєво не впливало на структуру селезінки: біла пульпа представлена характерними для неї клітинами: В-лімфобластами, лімфоцитами, плазмоцитами, макрофагами, незначною кількістю Т – лімфоцитів, дендритними, інтердигітантними та ретикулярними клітинами. Серед них інколи реєстрували апоптозно змінені клітини та апоптозні тільця (рис. 9.13). Для селезінки це є нормою, оскільки у ній постійно оновлюються клітини лімфоцитарного ряду. Залишкові тільця поглинаються макрофагами з подальшим їх розщепленням.

Після використання мультипробіотиків на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* в клітинах печінки тварин з дисбіозом, інфікованих ентеровірусами та сальмонелами, відмічалась певна нормалізація, проте спостерігались і неспецифічні зміни, які свідчили

про активацію процесів, що відбуваються у цьому органі (рис. 9.14 (А-Г)). В препаратах виявлені гепатоцити, які мали великі округлі ядра, 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 каналцях гранулярної ендоплазматичної сітки (рис. 9.14Б). Зростання кількості лімфоцитів у просвіті Діссе, очевидно, є результатом активації імунних реакцій, а збільшення числа жирових гранул у клітинах Іто, що включали жиророзчинні вітаміни, є свідченням активації процесів метаболізму печінки.

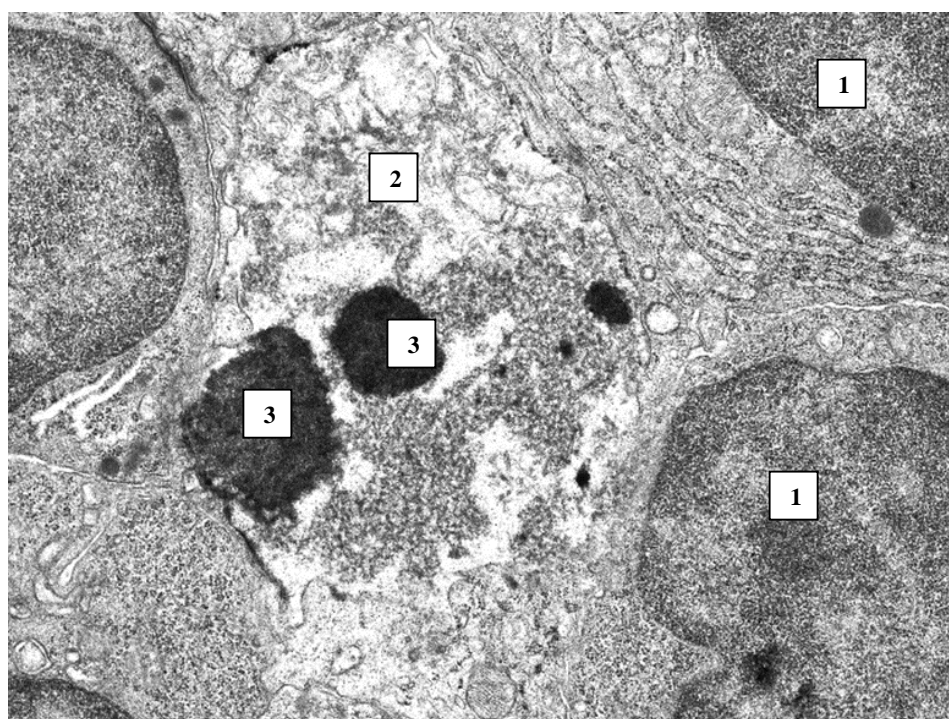


Рис. 9.13. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В та *Salmonella typhimurium*, після використання мультипробіотиків: лімфоцити (1), плазмоцити (2), апоптозні тільця (3). Збільшення 16000 \times .

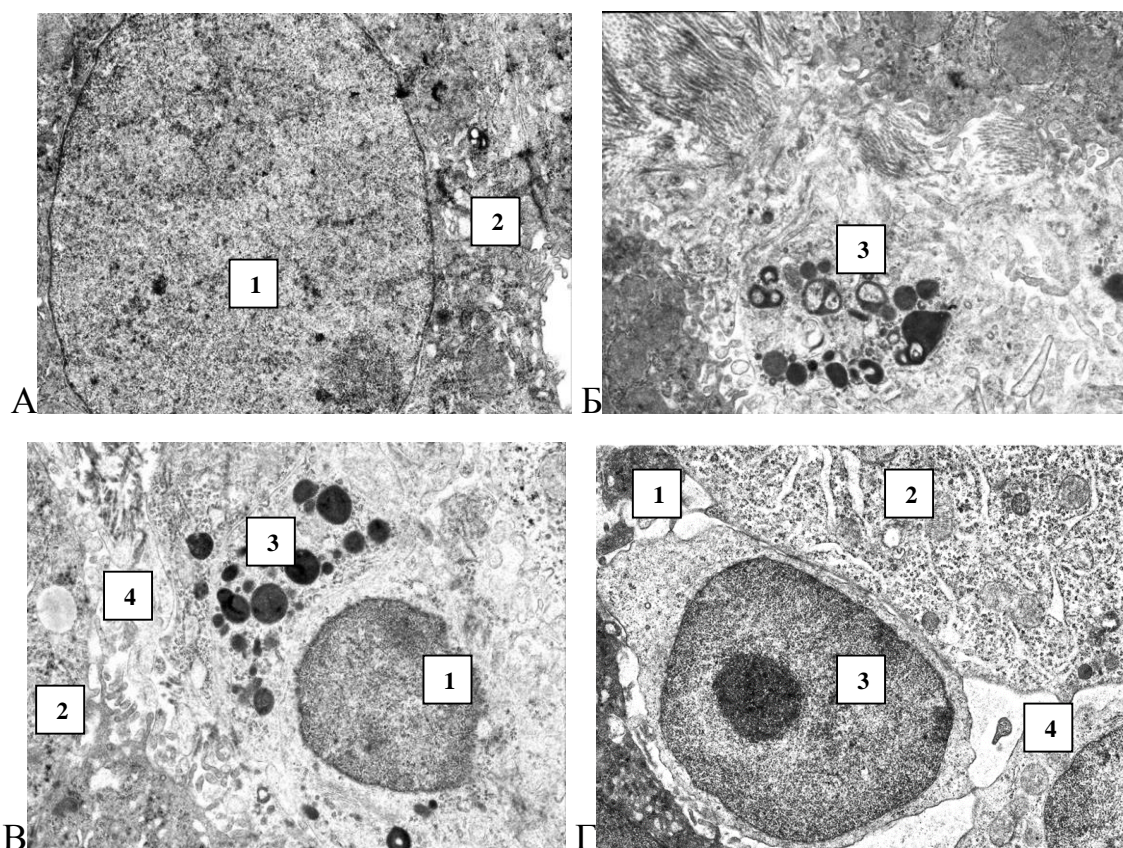


Рис. 9.14 – Електронна мікрофотографія. Печінка мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В та *Salmonella typhimurium*, після використання мультипробіотиків. А. Б. Ядро гепатоцита (1), контакт гепатоцитів (2), ділянка цитоплазми клітини(3); В. Ядро клітини Іто (1), гепатоцит (2), ліпідні гранули (3), простір Діссе (4); Г. Гепатоцит (1), гранулярна ендоплазматична сітка (2), лімфоцити (3), простір Діссе (4). Збільшення 14000×.

При використанні гелевої форми монтіорилоніту бентоніту в процесі моделювання дисбіозу у мишей, надалі інфікованих вірусно-бактеріальною сумішшю, відмічалось зменшення глибини порушень на рівні ультраструктурної організації слизової оболонки кишківника. Зрідка траплялись апоптозні зміни, спостерігали укорочення довжини мікроворсинок слизової, а місцями їх тотальну десквамацію, набряклість мітохондрій, формування аутофагосом, розширення міжклітинного простору та інші

морфологічні ознаки дисбіозу. Слід відмітити, що локальні апоптозні процеси, які супроводжувались ущільненням ядер, торкались і плазмоцитарних клітин (рис. 9.15).

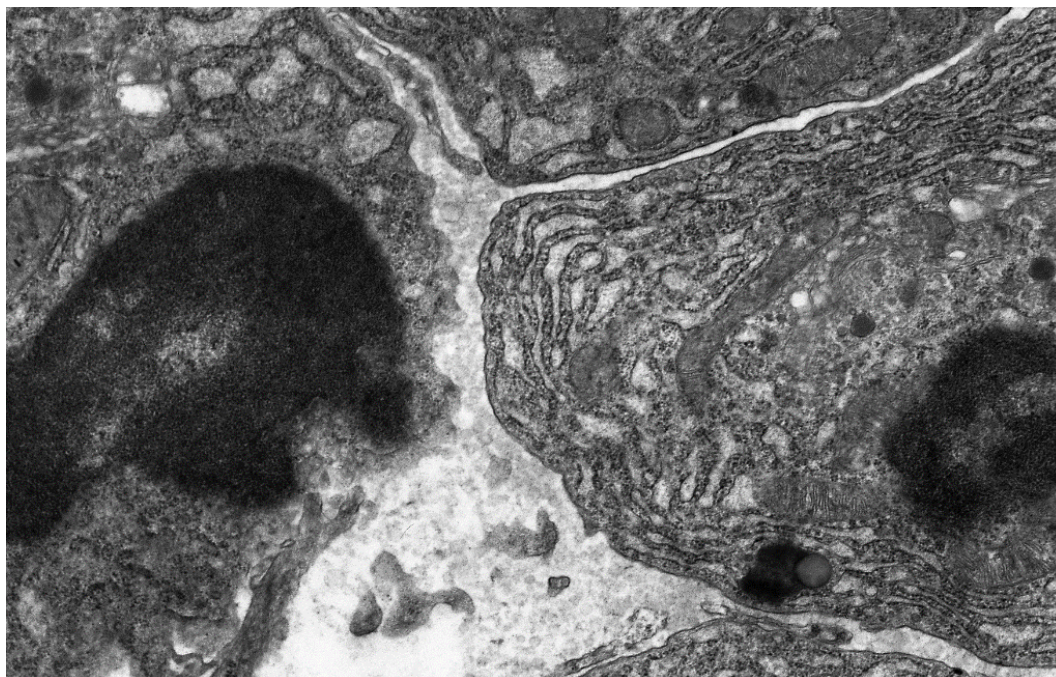


Рис. 9.15. Електронна мікрофотографія. Локальне ущільнення ядер плазмоцитів у мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В та *Salmonella typhimurium*, після використання гелевої форми бентоніту. Збільшення 14000×.

Електронно-мікроскопічні дослідження селезінки мишей за умов введення гелевої форми монтморилоніту бентоніту показали, що загалом ультраструктурна організації цього органу була не змінена – у селезінці представлений клітинний склад, притаманний цим тваринам у нормі. У білій пульпі лейкоцити, серед них лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги інколи трапляються апоптозні тільця. Такі структури спостерігали і у контрольній групі тварин як результат самоочищення від відпрацьованих клітин. У червоній пульпі виявлялось скупчення формених елементів крові: еозинофіли, лімфоцити, плазматичні клітини, тромбоцити, еритроцити, які

розміщувались у оточенні ретикулярних клітин. Частина клітин розміщена у судинних синусах та еліпсоїдних капілярах (рис. 9.16 А-Г)

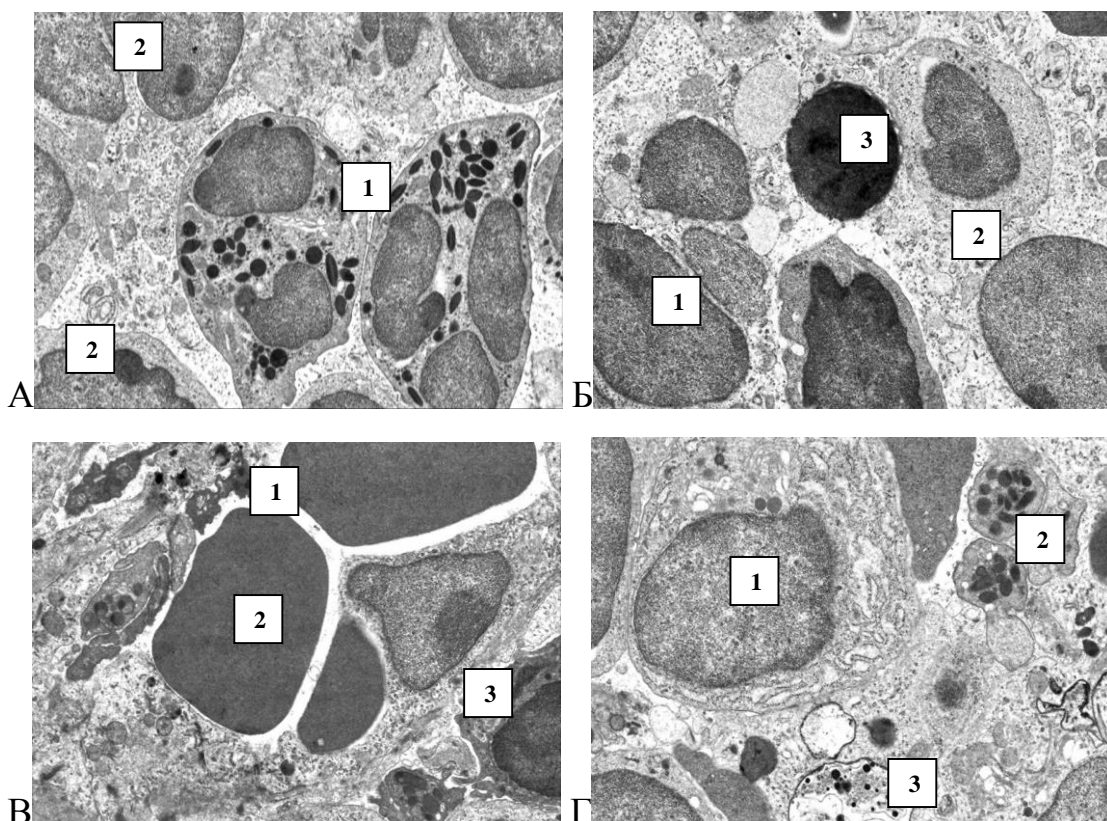


Рис. 9.16. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В та *Salmonella typhimurium*, після використання гелевої форми бентоніту. А. Еозинофіли (1) в оточенні лімфоцитів (2). Б. Лімфоцити (1), клітинний детрит (2) та зруйновані еритроцити (3). В. Електронна мікрофотографія. Селезінка мишей за умов введення сорбентів. Просвіт судини (1), еритроцити (2), ендотеліоцити (3). Г. Плазмоцити (1), тромбоцити (2), залишки макрофагів (3). Збільшення 12000×.

Крім того, морфометричний аналіз показав збільшення об'ємної частки світлих центрів лімфоїдних фолікулів та зниження показника об'ємної частки зони ПАЛМ (периартеріальні лімфоїдні муфти) у селезінці тієї дослідної групи

тварин, які отримували гелеву форму бентоніту. Натомість після використання пробіотиків достовірних змін зафіксовано не було (табл. 9.1).

Таблиця 9.1

Порівняльна морфометрична оцінка функціональних зон селезінки мишей в нормі, при дисбіозі та після корекції пробіотиками і сорбентами

Група спостережень	Об'ємна частка функціональних зон селезінки (%)			
	Лімфоїдні фолікули	Світлий центр	ПАЛМ	Червона пульпа
Контрольна	34,7±2,1	9,4±1,4	21,1±0,1	46,2±2,1
Дисбіоз	41,1±2,1	18,1±1,3*	12,7±0,1*	48,1±2,2
Корекція бентонітом	36,3±1,6	23,6±1,4**	15±1,3*	44,4±2,3
Корекція мультипробіотиком	37,9±4,7	17±1,5*	13±1,2*	47,3±2,2

Різниця достовірна:

*- в порівнянні з контролем

** - в порівнянні з групою «дисбіоз»

Електронно-мікроскопічно встановлено, що у печінці мишей, інфікованих вірусно-бактеріальною сумішшю, після використання сорбентів в процесі моделювання антибіотикоіндукованого дисбіозу були виявлені мінімальні зміни ультраструктур, які свідчили про незначне порушення метаболізму цього органу [344]. Переважна більшість жовчних капілярів мали розширений просвіт, практично у всіх мітохондріях крипти, на яких власне відбувається синтез АТФ, були структурно не виражені (рис. 9.17 А-Б). Виявлялись дещо розширені зони простору Діссе (рис. 9.17 Г). Разом з тим, у порівнянні з тваринами, які не отримували сорбенти, після використання гелевої форми бентоніту не було зафіксовано некротичних змін, не

відмічалось також цитолізу гепатоцитів, масової загибелі 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.

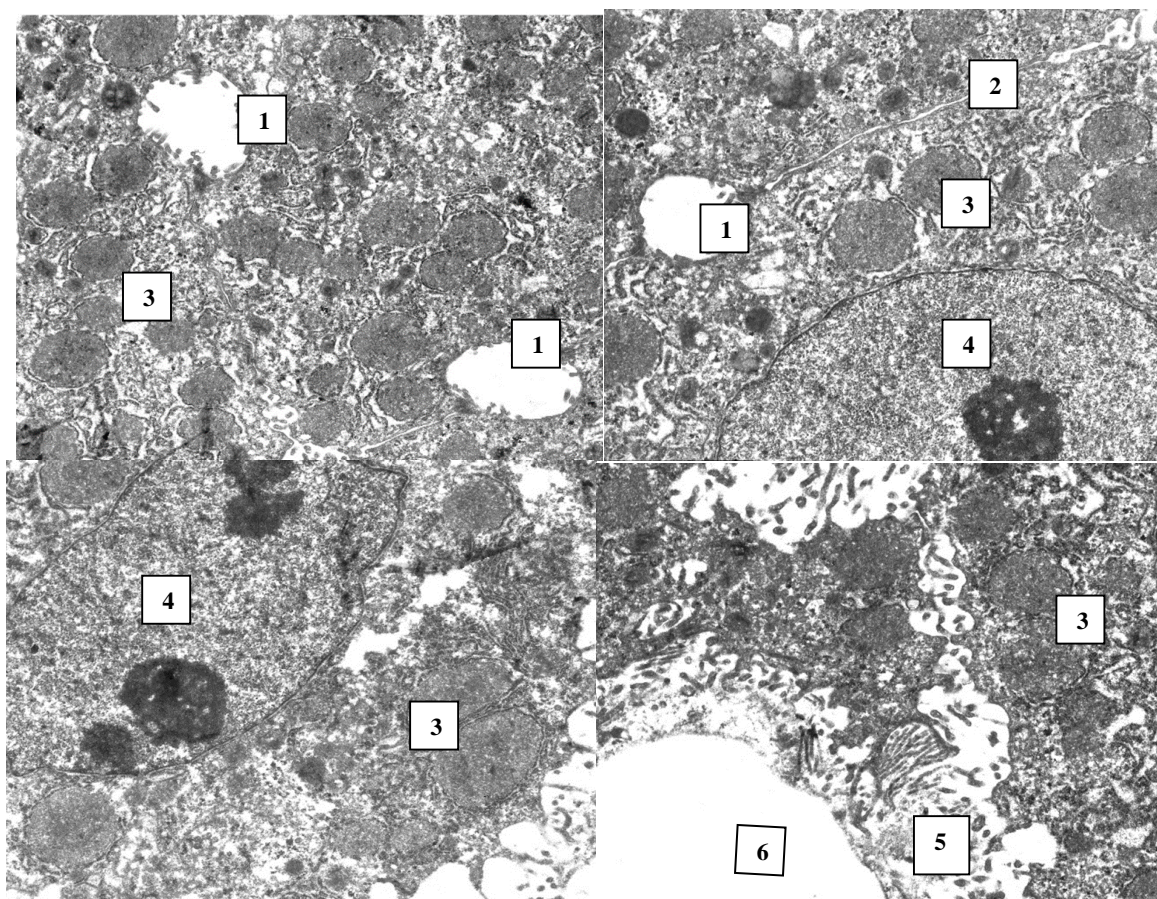


Рис. 9.17. Електронна мікрофотографія. Печінка мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В та *Salmonella typhimurium*, після використання гелевої форми бентоніту. Просвіт жовчних капілярів (1), контакт гепатоцитів (2), мітохондрії (3), ядро гепатоцита (4), простір Діссе (5), просвіт капіляра (6). Збільшення 14000×.

Отже, не зважаючи на те, що використання гелевої форми монтморилоніту бентоніту в процесі моделювання дисбіотичних станів у мишей мало впливало на мікробіологічні показники дисбіозу, експерименти дозволили встановити в даних препаратів виражену гепатопротекторну функцію, яка проявляється зменшенням деструктивних змін, що супроводжують процес моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу. Очевидно, ентеросорбенти сприяють вилученню, фіксації та видаленню з шлунково-кишкового тракту бактеріальних токсинів, продуктів природного обміну у високих концентраціях, активованих ферментів, медіаторів запалення, біологічно-активних речовин, умовно-патогенних мікроорганізмів, вірусів тощо.

Загалом, 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 – у печінці.

Висновки до розділу 9.

На прикладі мультипробіотику на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* доведено властивість пробіотичних препаратів сприяти зменшенню глибини цитодеструктивних змін в тонкому кишківнику при формуванні антибіотикоіндукованого дисбіозу та нормалізації імунних реакцій організму, які супроводжують розвиток таких порушень, а також показано, що їх профілактичне використання у мишей з дисбіозом, інфікованих Коксакі В3, сприяє редукції ініційованих вірусами апоптозних процесів.

Встановлено, що в процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу використання пробіотиків дає виражений профілактичний ефект, який проявляється зменшенням цитодеструктивних

ознак дисбіозу в кишківнику, зокрема відсутністю тотальної десквамації мікроворсинок, згладженості плазматичної мембрани, набряку мітохондрій та формування аутофагосом, а також ознак апоптозу. Разом з тим, показано, що використання пробіотиків в процесі моделювання вірусно-бактеріального інфекційного процесу на фоні дисбіозу не суттєво сприяло відновленню структурної організації селезінки та печінки у тварин.

За результатами досліджень, зміни, які супроводжували нормалізацію ультраструктурної організації кишківника після використання сорбенту бентоніту були менш помітними, у порівнянні з профілактичним ефектом пробіотичних препаратів. Водночас, використання сорбентів при моделюванні вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу дозволило виявити у них гепатопротекторну властивість, направлену на збереження ультраструктурної організації печінки та нормалізацію її метаболізму, що дозволяє рекомендувати ці препарати як складову частину комплексної терапії вірусно-бактеріальних інфекцій.

Основні положення, викладені у розділі 9, опубліковані у наступних наукових працях:

1. 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>.
2. 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.

РОЗДІЛ 10

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Не зважаючи на складність виявлення і ідентифікації вірусів в шлунково-кишковому тракті, нещодавні дослідження з використанням методу секвенування генетичного матеріалу, отриманого з різних біотопів людини, виявили існування складного кишкового вірому [6, 7, 156, 345]. До його представників можна віднести і пікорнавіруси, які в основному виділяються з шлунково-кишкового тракту [9, 10]. Наші результати, в свою чергу, показують присутність в кишківнику людини цілої «плеяди» цитопатогенних агентів (ЦПА), які, очевидно, в більшості мають вірусну природу, та зафіксовано різну частоту їх реєстрації в залежності від наявності дисбіотичних порушень. Так, в матеріалі, взятому від осіб з дисбіозами, ЦПА вдалось виявити у 14,5%. Водночас у осіб з відсутніми порушеннями з боку мікробіоценозу кишківника ці показники становили 8,76% ($p < 0,01$). Найчастіше ЦПА реєструвались у зразках, взятих від дітей першого-другого року життя, а також у 6-7-річних дітей та підлітків, що ми пов'язуємо з активною імунізацією живою поліовірусною вакциною, яка проводиться в цей період відповідно до затвердженого в Україні Національного календаря профілактичних щеплень [262].

ПЛР підтверджено ентеровірусне походження більшості ЦПА – з 56 досліджених зразків від осіб з дисбіозами 39 виявилися такими, що містили ентеровірусну РНК, це становить 69%. Натомість, з 31 ЦПА, виділених від людей з непорушеною мікрофлорою, лише у 12 випадках було зафіксовано наявність нуклеїнової кислоти ентеровірусів (38%). Останні показники є близькими до даних, отриманими іншими дослідниками, які у 2016-2018 рр. проводили молекулярно-генетичну ідентифікацію 238 цитопатогенних агентів, ізольованих як від пацієнтів, так і з навколишнього середовища, та

встановили присутність ентеровірусної РНК у 49,5 %, з них 10,9% поліовірусів та 38,6% - ентеровірусів неpolіомієлітного походження [346].

Встановлено зростання частоти виділення ентеровірусів у осіб з порушенням складу нормальної мікрофлори кишківника (з 386 досліджених зразків виділено 34 штами ентеровірусів, з них поліовірусів – 24, вірусів Коксакі В – 7, вірусів ЕСНО – 3, виявились нетипованими – 5 штамів) в порівнянні з особами, в яких бактеріологічно не підтверджено порушень мікробіоценозу кишківника (з 354 досліджених зразків виділено 12 штамів ентеровірусів, серед них нетиповані ентеровіруси (6 штамів), поліовіруси (група С) (4 штами) та віруси Коксакі В (група В) (2 штами). В даній категорії привертає увагу великий відсоток нерозшифрованих ЦПА, що частково можна пояснити як наявністю одночасно двох та більше серотипів ентеровірусів в одному зразку, так і появою нових антигенних варіантів або рекомбінантних вірусів, які не нейтралізувалися використаним набором діагностичних імунних сироваток.

Не дивлячись на те, що частота виявлення ентеровірусної нуклеїнової кислоти в фекаліях людей, за деякими даними, може перевищувати 30%, виділити ентеровіруси дослідникам вдалось лише у 1-2% здорового населення, при чому більшість виділених вірусів належить до групи Коксакі В [327, 347]. Ці дані загалом узгоджуються з результатами наших вірусологічних досліджень (1,8 % людей з непорушеним мікробіоценозом кишківника виділяє ентеровіруси). Водночас відсоток виділення ентеровірусів при дисбіотичних порушеннях (8,8%) наближається до тих показників, які реєструються у дітей з антенатальною та перинатальною патологією (8%) [327].

Результати ізоляції вірусів від людей з підозрою на ентеровірусну інфекцію та дослідження вірусних ізолятів з зовнішнього середовища показують, що найбільша питома вага ентеровірусів припадає на віруси групи Коксакі В (44% із стічних вод України та 30% із клінічного матеріалу). Дещо меншу частку займають ентеровіруси групи ЕСНО (33% із стічних вод України та 27% із клінічного матеріалу) та поліовіруси (22% із стічних вод

України та 14% із клінічного матеріалу) [296]. Видовий спектр ентеровірусів, виділених нами від осіб з дисбіотичними порушеннями, відрізняється від вказаних вище результатів – в осіб з дисбіозом на перше місце за частотою реєстрації виходять ізоляти поліовірусів.

Існують наукові повідомлення про зростання тривалості виділення вакцинних поліовірусів людьми з імунодефіцитом, що, на думку вчених, може сприяти реверсії їх нейровірулентності [271, 272, 273, 276]. Разом з тим, іспанські вірусологи, навпаки, повідомляють про збільшення швидкості елімінації аденовірусів та ентеровірусів з каловими масами у хворих з імунодефіцитом, зокрема у пацієнтів з ВІЛ [380]. Тимчасове зменшення чисельності і різноманітності мікробіому кишківника, що спостерігалось після інфікування ВІЛ, не є специфічним для даного захворювання. В хронічній фазі відмічалось характерне зниження чисельності представників родів *Akkermansia*, *Anaerovibrio*, *Bifidobacterium* і *Clostridium*. Дисбіотичні зміни у таких хворих дослідники пов'язують з хронічним запаленням, анергією CD4 лімфоцитів та Т-клітин і порушеннями метаболізму. В деяких наукових працях йдеться про те, що рівень ураження імунної системи людини при ВІЛ-інфекції може бути пов'язаний з дисбіозом кишківника [20, 21]. Вчені також відмічають життєво важливу роль мікробіоти у дозріванні специфічної імунної системи (а саме лімфоїдних органів), які також служать першою лінією захисту слизової шлунково-кишкового тракту [23].

Отримані нами дані ПЛР досліджень показали, що частота виявлення ентеровірусної РНК в осіб з ВІЛ не перевищує аналогічних показників у здорових осіб. Водночас вірусологічні методи свідчать про відсутність зростання частоти виділення ентеровірусів від людей з імунодефіцитами. Ці дані певним чином корелюють з результатами досліджень штамів поліовірусів, виділених у дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, та, на нашу думку, можуть свідчити про те, що імунізація ВІЛ-інфікованих живою оральною поліомієлітною вакциною не сприяє поширенню циркулюючих

вакцинних поліовірусів і не може суттєво вплинути на реалізацію стратегії ВООЗ з ліквідації поліомієліту в усьому світі [274, 275].

Залишається відкритим питання поширення інших кишкових вірусів, в тому числі і бактеріофагів, в осіб з дисбіотичними розладами. В наш час однією з найчастіших причин спорадичних випадків і спалахів ГКІ у світі являється норовірусна інфекція, яка особливо поширена в країнах, що розвиваються: там даний збудник є причиною 15-18 % всіх випадків ГКІ у людей, незалежно від віку, статі та соціального статусу [282, 283]. Деякі дослідники вказують на порівняно вищу частоту реєстрації вірусів Норфолк в осіб з дисбіозами та людей з імунодефіцитом [279, 280, 281]. Однак, в даному питанні одностайної думки не існує. Ряд з вчених робить протилежні висновки – в осіб з ВІЛ не відмічається збільшення частоти реєстрації вірусів Норфолк. Остання позиція підтверджується і нашими даними. Водночас нами зафіксовано зростання присутності кишкових вірусів в осіб з дисбіотичними розладами, що свідчить про перспективність вивчення норовірусної інфекції на сьогодні як в Україні, так і в цілому у світі. Слід відмітити, що відносно невелика кількість досліджених нами осіб не дозволило провести кореляційного аналізу поєднання дисбіотичних порушень та присутності вірусів Норфолк у матеріалі, через що одержані дані не можна вважати остаточними. Ми продовжуємо ці дослідження.

В деяких публікаціях йдеться про пряму кореляцію між частотою виділення соматичних або F-специфічних бактеріофагів та концентрацією ентеровірусів в навколишньому середовищі [348]. Результати наших попередніх досліджень дають підґрунтя розглядати їх навіть з позиції моделі вірусологічної оцінки чистоти об'єктів навколишнього середовища [278]. Існують повідомлення про наявність F-специфічних фагів у фекальних масах 10-20% людей, а в деяких тварин цей показник може досягати 70%. Нами дані віруси виділялись у низьких концентраціях, при чому у людей з не порушеною мікрофлорою кишківника цей відсоток становив 3,03%, а у людей з дисбіозом – 4,59% ($p < 0,01$). Разом з тим, не претендуючи на порівняння частоти

виділення бактеріофагів від людей з частотою їх виділення з об'єктів навколишнього середовища, слід відмітити, що 66,7 % проб стічних вод м. Києва містили F-специфічні РНК-бактеріофаги [267]. Не дивлячись на те, що вчені називають стічні води «колективним кишківником», на сьогоднішній день адекватного пояснення встановленої різниці ми запропонувати не можемо.

Особливо важливо при дослідженні вірусних ізолятів від осіб з дисбіозом вивчити у них ознаки вірулентних властивостей. Використані в роботі генетичні маркери вірулентності (маркер gct_{40} , бентонітовий маркер та маркер S), на нашу думку, здатні достатньо об'єктивно охарактеризувати вірулентність досліджуваних ізолятів. Необхідність одночасного дослідження декількох генетичних маркерів вірулентності може мотивуватись тим, що на основі аналізу лише одного з них важко диференціювати вірулентні та авірулентні штами. Відповідно до наших даних, за маркерами вірулентності ізоляти поліовірусів 1-3 типу, виявлені від осіб з дисбіозом і від здорових осіб, диференціювати не можливо – усі вони мали ознаки авірулентних, які не здатні розмножуватись при 40°C, мають високий афінитет до бентоніту та утворюють бляшки великого розміру. Разом з тим, зафіксовано зростання частоти реєстрації позитивних маркерів вірулентності у вірусів Коксакі В, виділених при дисбіозі, в порівнянні зі штамами, одержаними від осіб з непорушеним мікробіоценозом кишківника. Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників, в яких йдеться про зростання частоти виділення генетичного варіанту $A_{\text{бент}}$ при патологічних процесах. Так, наприклад, лише варіант $A_{\text{бент}}$ вірусу Коксакі В здатний долати плацентарний бар'єр у вагітних мишей та викликати загибель 91,2 % плодів і новонароджених мишенят, водночас він частіше реєструвався в осіб з кишковими інфекціями та неврологічними порушеннями, зокрема з гострим порушенням мозкового кровообігу [264, 295, 327, 349].

Віруси ЕСНО, виділені нами від осіб з дисбіозом, були наділені різною здатністю до репродукції при 40°C. Один з одержаних штамів за цією ознакою

визначений як вірулентний, два інші мали характеристику gct_{40}^- . Усі штами вірусів ЕСНО, одержані від осіб з дисбіозом, виявились не здатними до сорбції на бентоніті при нейтральних та слаболужних рН та за цією ознакою відносились до вірулентних. Ці результати корелюють з працями, в яких йдеться про те, що більш як 90 % ізолятів вірусів ЕСНО, одержаних від хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, та 63 % штамів вірусів ЕСНО, виділених від інших хворих, мали позитивні зазначені маркери віруленості [288, 295]. Слід відмітити, що у нетипованих ентеровірусів, виділених від осіб з дисбіозом, позитивні маркери вірулентності зустрічалися удвічі частіше, порівнюючи з особами в яких були відсутні порушення мікробіоценозу кишківника. У відповідності з даними, отриманими Ворошиловою М.К., після репродукції в кишківнику людей ентеровіруси можуть змінювати свої маркери вірулентності, зокрема gct_{40} [290]. В працях Демчишиної І.В., яка проводила моніторинг в Україні поліовірусів вакцинного походження (ПВВП), також описано можливість довготривалої персистенції поліовірусів в організмі людини з поступовою зміною їх генетичних властивостей та зростанням вірулентності [350]. Не виключено, що висока частота реєстрації позитивних маркерів вірулентності у нетипованих ентеровірусів, ізольованих від осіб з дисбіозом, відбиває саме цю закономірність. Водночас не виключено, що розмноження ентеровірусів в шлунково-кишковому тракті може супроводжуватись як набуттям нових вірулентних ознак, так і їх редукцією. А віруси Коксакі і ЕСНО продовжують еволюціонувати. Процес набуття вірулентних ознак триває, і на сьогодні не можна ще спрогнозувати майбутнє цих груп ентеровірусів щодо дисбіозу.

В окремих наукових працях йдеться про найбільшу інформативність маркеру gct_{40} у ентеровірусів, за ним бентонітовий маркер та маркер S [296, 297]. В наших дослідженнях, серед ентеровірусних ізолятів, отриманих від осіб з дисбіозом, найчастіше реєструвався позитивний маркер S (18 штамів), далі за частотою реєстрації йшли бентонітовий маркер та маркер gct_{40} (по 16 та 10 штамів) [298]. Ці дані є близькими до результатів дослідження

ентеровірусних маркерів у штамів, виділених з навколишнього середовища [299]. На основі аналізу генетичних маркерів зроблено висновок про спільні фенотипові особливості ентеровірусів, виділених нами від осіб з дисбіозом: низький афінитет до бентоніту (маркер $A_{\text{бент}^-}$), формування дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S+) та здебільшого позитивний маркер gct_{40} . Ми вважаємо, що в різних умовах зміна характеристики маркерів (з невірулентних на вірулентні) не є прогнозованою. Різні фактори зовнішнього середовища по різному впливають на геном ентеровірусів, спричиняючи еволюційні зміни. Про це свідчить і їх зростання резистентності в зовнішньому середовищі.

З огляду на можливу постійну присутність ентеровірусів у кишковому тракті осіб з дисбіотичними порушеннями, великого значення набуває питання тривалості виживання ентеровірусів та з'ясування факторів, які на це впливають. Нами показано зростання резистентності при зберіганні вірусних ізолятів Коксакі В, виділених при дисбіотичних порушеннях у порівнянні з їх «музейними» аналогами. Дослідники повідомляють про зростання стійкості вірусів, виділених з об'єктів навколишнього середовища, зокрема зі стічних вод, у порівнянні з лабораторними штамми. В даному випадку вони пов'язували такі властивості з присутністю в стічних водах органічних речовин та адсорбцією вірусу на завислих частках, а також не виключали, що різні фізико-хімічні фактори, які можуть впливати на ентеровіруси в навколишньому середовищі, сприяють відбору з гетерогенної популяції найбільш стійких варіантів вірусів та закріпленню цієї ознаки у них в подальшому [270, 297]. При цьому, очевидно, механізм виживання у клінічних ізолятів є дещо інший, і він потребує детального вивчення. Слід зважати і на певний вплив імунної системи і мікробіому на ентеровіруси.

Крім того, порівняльний аналіз тривалості збереження життєздатності ізолятів вірусів Коксакі В та нетипованих штамів, виділених від здорових осіб та людей з дисбіозом при різних температурних режимах показав їх диференціацію за цією властивістю. Зокрема, при температурі +20 та +37°C

тривалість збереження інфекційної активності ізолятів від осіб з дисбіозом зростала майже вдвічі, порівнюючи зі штамми, отриманими від людей з непорушеною мікрофлорою кишківника. Не виключено, що це може бути пов'язано з зростанням вірулентності даних вірусів в умовах адаптації до дисбіотичних розладів у кишківнику, оскільки виражена резистентність часто є ознакою високої вірулентності [292].

При виділенні ентеровірусів з клінічного матеріалу особливо важливими є методичні підходи, серед яких вибір чутливих культур клітин займає чільне місце. На сьогодні жодна з клітинних культур не є універсальною для індикації всіх видів ентеровірусів. Дослідники пропонують періодично визначати чутливість культур клітин і найбільш чутливі з них використовувати для ідентифікації ентеровірусів [351, 288, 351]. Нами показано, що чутливість окремих ліній культур клітин до ентеровірусних ізолятів є неоднаковою, через що запропоновано використовувати комбінації декількох клітинних культур. На наш погляд, оптимальними для проведення моніторингу поширеності ентеровірусних інфекцій є культури клітин L20B, на яких добре виділяються поліовіруси, та HEp-2, що найбільш чутливі при виділенні інших видів ентеровірусів. Цю комбінацію можна рекомендувати для швидкого виділення та ідентифікації ентеровірусів з фекальних мас.

Для повноцінного дослідження ентеровірусних ізолятів важливими є також методичні підходи, які можуть забезпечити їх якісну морфологічну верифікацію. В цьому аспекті одним з принципових завдань є вибір ефективного способу концентрування вірусних агентів. Оптимальним, з нашої точки зору, методом концентрування ентеровірусів з метою їх електронно-мікроскопічної індикації є метод концентрування бентонітом, який дозволяє отримати не лише високі титри вірусного концентрату, але очистити вірусні часточки від неспецифічних забруднювачів.

Електронна мікроскопія в медичній практиці використовується достатньо рідко, хоча дослідники протягом тривалого часу демонструють ефективність даного методу при лабораторній діагностиці низки вірусних

інфекції [309, 310]. На наш погляд, насамперед обмеженість використання даного методу у лабораторній практиці пов'язана з його низькою чутливістю, оскільки при не високій концентрації вірусів (менше $6,0 \cdot 10^6$ ТЦД₅₀/100мкл) їх електронно-мікроскопічна ідентифікація є складною. Нами доведено можливість отримання препаратів з високою концентрацією ентеровірусів безпосередньо на плівці-підложці, попередньо обробленої бентонітом. Хоча чутливість такої індикації ентеровірусів в клінічному матеріалі порівняно не висока – візуально вдалося ідентифікувати ентеровіруси в 60%, нами вперше показано можливість ЕМ дослідження клінічних ізолятів ентеровірусів без попереднього концентрування вірусомісного матеріалу. Слід відмітити, що дана методика показала свою ефективність при індикації не лише ентеровірусів, але й інших мікроорганізмів, зокрема бактеріофагів, вірусів герпесу та ін. Використовуючи вище вказані особливості підготовки препаратів, вдалось провести електронно-мікроскопічну верифікацію нетипованих ентеровірусів та забезпечити суттєве зростання чисельності повноцінних віріонів, тобто з наявною нуклеїновою кислотою.

Для більш адекватної корекції дисбіотичних порушень у кишківнику людей було доцільно в експерименті на лабораторних тваринах виявити фактори і умови, які сприяють формуванню такого стану. Отже, з метою вивчення характеру змін, складу і властивостей кишкової мікрофлори, а також для обґрунтування раціональних підходів корекції мікроекологічних порушень, необхідна розробка адекватної біологічної моделі. Це тим більш важливо з огляду на те, що отримані в експерименті на лабораторних тваринах результати можна в подальшому екстраполювати на організм людини як у плані профілактики, так і лікуванні дисбіотичних станів. У створенні моделі дисбіотичних порушень на лабораторних тваринах використовувались різні підходи [231, 232, 233, 236, 237]. Враховуючи, що серед багатьох факторів, які призводять до формування і розвитку дисбіозів кишківника, антибактеріальна терапія відноситься до однієї з провідних причин, саме модель антибіотикоіндукованого дисбіозу буде найбільш адекватно

відображати зміни, які відмічаються у природних біотопах. Аналіз бактеріологічних показників ефективності моделювання дисбіозу у тварин свідчить про можливість використання усіх взятих для експерименту антимікробних препаратів (тетрацикліну, канаміцину, гентаміцину, ампіциліну та метронідазолу) з метою формування дисбіозу кишківника. Разом з тим, за нашими даними, найбільш виражений дисбіотичний процес формується в результаті використання комбінації препаратів ампіциліну та метронідазолу.

В наш час принципово новим є моделювання дисбіозу у тварин з використанням антисептиків, оскільки лише останніми роками з'явилися наукові праці, в яких йдеться про ефективність використання в медичній практиці антисептиків кишкової дії, зокрема декаметоксину [353]. Декаметоксин є четвертинною амонієвою основою [354, 355]. Як відомо, полярні сполуки погано проникають через шкіру і слизові оболонки, не всмоктуються в кишечнику, створюючи високу концентрацію безпосередньо у вогнищі інфекції, а також не мають системної дії [312, 313]. Нами встановлено, що використання ДКМ не формує виражених дисбіотичних порушень та мало впливає на основні мікробіологічні показники – маркери дисбіозу. Водночас після використання антисептиків в комплексі з антибіотиками на порядок відмічається зниження такого показника, як загальне мікробне число, порівнюючи з тими моделями, в яких для формування дисбіозу використовувались лише антибіотики, інші показники змінювались не суттєво. В цілому, отримані результати свідчать про перспективність даної комбінації для моделювання дисбіотичних процесів у тварин. Особливо важливим, на наш погляд, є той факт, що, не зважаючи на зниження загального мікробного числа, концентрація *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.* після використання ДКМ знижувалась незначно. Ми вважаємо, що це має цінне практичне значення, оскільки лікування кишкових інфекцій антисептичними препаратами, ефективність яких в наш час

інтенсивно обговорюється, не буде супроводжуватись реактивними порушеннями з боку кишкового мікробіоценозу.

Наразі залишається ключовим питання: чи впливає мікробіом на вірусну реплікацію в шлунково-кишковому тракті і якщо впливає, то чи змінює вірулентність вірусів? Існують наукові роботи в яких йдеться про зниження сприйнятливості мишей до поліовірусів після лікування антибіотиками. Такі результати дослідники пов'язують з присутністю в складі мікробіому бактерій, що містять поверхневі полісахариди, в тому числі ліпополісахариди і пептидоглікани, які здатні збільшувати вірулентність ентеровірусів, сприяючи розвитку вірусних патологій [12]. Дослідження динаміки утворення віруснейтралізуючих антитіл до поліовірусів у кролів з дисбіозом на введення живої поліовірусної вакцини показали, навпаки, значне зниження рівнів антитіл до поліовірусів всіх типів, особливо до PV2 і PV3 порівнюючи з групою здорових тварин [292].

За нашими даними формування дисбіотичних порушень призводить до скорочення часу звільнення організму лабораторних тварин від ентеровірусів. Термін виведення ентеровірусів у тварин контрольної групи становив 10 діб, що майже вдвічі перевищував тривалість виділення вірусів у тварин з порушеним мікробіоценозом кишківника. Таким чином, антибіотики суттєво впливають на патогенез захворювання. Скорочуючи термін захворювання, вони, швидше за все, призводять до втрати певних стадій патогенезу і це, як ми вважаємо, є позитивним фактором в лікуванні вірусно-бактеріальних гострих кишкових інфекцій.

Результати власних досліджень показали здатність деяких живих видів пробіотичних штамів мікроорганізмів, а також мультипробіотичних препаратів на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* скорочувати тривалість виділення вірусів поліомієліту у тварин з непорушеним мікробіоценозом кишківника. Водночас використання даних препаратів у тварин з штучно сформованим дисбіозом в більшості не впливало на динаміку звільнення їх організму від ентеровірусів.

Відмічено, що вживання окремих мікроорганізмів, зокрема з роду *Bacillus*, навпаки, сприяє зростанню тривалості виділення вірусів. Отже, не виключено, що віруси можуть використовувати деяких представників кишкового мікробіому для забезпечення збереження своєї життєздатності. Подальші експерименти, направлені на визначення тривалості виділення та інфекційної активності ентеровірусів в присутності інактивованих форм мікроорганізмів, дозволили висловити припущення, що зростання збереження інфекційності ентеровірусів залежить від виду бактерій, при чому їх стан (живі чи інактивовані) не має значення. Отримані нами дані також демонструють зниження концентрації вірусів у вмісті тонкого кишківника тварин із сформованими дисбіотичними порушеннями, що особливо виразно проявляється через 120 хв після інфікування. Меншою мірою така закономірність простежується і при вірусологічному дослідженні вмісту товстого кишківника. Крім того, експериментально обґрунтовано зростання інтенсивності інактивації поліовірусів у фекальних масах тварин з дисбіозом. Близькі результати описані при дослідженні впливу бактеріальних клітин на інфекційність реовірусів, титри яких в кишківнику мишей, які не підлягали лікуванню, виявились значно вищими, ніж у тих, які пройшли лікування антибіотиками [13]. Можливо, окремі види мікроорганізмів – представників нормобіоценозу кишківника, крім надважливих пробіотичних функцій, здатні сприяти прогресуванню вірусних захворювань шляхом прямого або опосередкованого впливу на збереження їх збудників. Не виключено, що пригнічення антибіотиками окремих видів бактеріальних популяцій може мати противірусний ефект. Водночас дослідниками, які вивчали вплив бактерій на інфекційний титр вакцинного поліовірусу в перещеплюваній клітинній культурі НЕр-2, навпаки, вдалось показати властивість окремих бактерій, зокрема *B. longum* впливати на репродукцію поліовірусів зі зниженням їх інфекційного титру на 4,0–4,25 lg ТЦД₅₀ *in vitro* [292]. Натомість при інфікуванні *L. acidophilus* цей показник знижувався на 1,5–1,75 lg ТЦД₅₀,

а *L. acidophilus* та *S. thermophilus* за даних умов взагалі не впливали на репродукцію поліовірусу [292].

Разом з тим, останніми роками показано здатність кисломолочних бактерій сприяти зниженню титру вірусу Ебола та цитомегаловірусів, описана протигрипозна активність штаму *L. lactis* JCM 5805 та доведена здатність пробіотиків сприяти зменшенню частоти вірусних інфекцій органів дихання, викликаних риновірусами [183].

Особливо інтенсивно сьогодні вивчається вплив пробіотиків на патогенез COVID-19. Розуміння механізмів розвитку інфекції SARS-CoV2 може надати нові можливості для її попередження та / або лікування. Очевидно, цього можна досягти або на етапі входження вірусу в клітину, або через пригнічення посиленої імунної відповіді, викликаної інфекцією, відомої як «цитокіновий шторм».

Очевидно, в основі порушення функцій та механізмів взаємодії макроорганізму та індигенної мікробіоти, асоційованої зі слизовими оболонками порожнин лежать зміни, які проявляються на ультраструктурному рівні. Вивчаючи їх особливості при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника, нами було показано чіткі ультраструктурні ознаки, характерні саме для даного процесу: вкорочення та десквамація мікроворсинок, набряк мітохондрій, просвітлення матриксу цитоплазми, порушення зв'язку між епітеліальними клітинами та ін. Ми частково розділяємо думку інших дослідників, які стверджують, що дисбіози завжди супроводжуються морфологічною картиною токсичного ентериту з вогнищевою дистрофією, вогнищевим субепітеліальний набряком, десквамацією епітелію кишкових ворсинок та лімфоїдно-гістіоцитарною інфільтрацією стромы слизової оболонки з домішками нейтрофілів [241, 356]. Інколи така картина супроводжується збільшенням числа міжепітеліальних лімфоцитів та зменшенням об'ємної частки келихоподібних клітин [357]. В деяких працях навпаки повідомляється про гіпертрофію та гіперплазію (збільшення об'ємної частки) слизоутворюючих келихоподібних клітин у

тварин з первинним дисбіотичним станом а також виражену деструкцію залоз [98, 234, 241]. Нам достовірних змін, пов'язаних з келихоподібними клітинами, зафіксувати не вдалось. В цілому вплив дисбіотичних порушень на всмоктувальну та секреторну активність тонкого кишківника на сьогодні залишається мало вивченим.

Водночас при індукції дисбіозу за нашою методикою, на відміну від моделювання ацетамінофеном, не було зафіксовано виражених некротичних змін у клітинах, а саме: лізису ультраструктур, глибоких інвагінацій ядерної оболонки як на апікальній, так і на базальній полюсах клітин, значної кількості рудиментарних ядер ентероцитів, що відображає активацію процесів апоптозу [235]. На нашу думку, описані ультраструктурні зміни більшою мірою пов'язані не з дисбіотичними процесами, а з вираженою токсичністю самих препаратів, які використовуються дослідниками для моделювання дисбіотичних станів у тварин.

В науковій літературі обговорюється імуномодулююча дія мікрофлори кишківника на організм, яка проявляється в стимуляції гуморального і клітинного ланок імунітету [358]. Наразі не існує єдиної думки стосовно зв'язку дисбіозу з імунітетом. Зокрема, не до кінця ясно, що первинним є в цьому процесі – порушення мікробіоценозу ведуть до розвитку імунодефіцитів, або мікроекологічні зрушення в біоценозах розвиваються внаслідок несприятливого впливу зовнішніх факторів на систему захисту організму, особливо на місцевому рівні. У зв'язку з цим зростає інтерес до вивчення структурно-функціональних змін органів імунної системи, що розвиваються на фоні дисбалансу кишкової мікрофлори. Наші результати доводять ультраструктурні зміни, які можуть бути пов'язані з активізацією імунних процесів при формуванні дисбіозу у тварин. Про це свідчить поява значної кількості клітин Панета в досліджених зрізах слизової оболонки тонкого кишківника. Таким клітинам відведено важливу роль у регуляції кишкового гомеостазу, їх визначають також як важливу складову захисних механізмів неспецифічного антимікробного захисту [359]. Про активізацію

імунних процесів свідчить і зростання числа просвітних еозинофілів та базофілів, які є показником алергізації, оскільки беруть безпосередню участь в захисних алергічних та анафілактичних реакціях організму. Нами також вперше зафіксовано збільшення чисельності плазматичних клітин з розширеними каналцями, найбільш ймовірно, за рахунок їх наповнення імуноглобулінами. Про активізацію імунної відповіді може також свідчити і зростання кількості В-лімфоцитів між ентероцитами та у просвіті капілярів. Отримані дані підтверджуються науковими публікаціями інших дослідників, які демонструють збільшення на фоні дисбіозу кількості нейтрофілів серед клітинних елементів власної пластинки слизової оболонки, а також зростання числа міжепітеліальних лімфоцитів [241]. Ймовірно, структурно-морфологічні зміни у кишківнику залежать і від вибору препаратів для моделювання дисбіозу. Так, при використанні ацетамінофену – у власній пластинці, навпаки, відмічалось зменшення числа лімфоцитів, еозинофілів та тучних клітин [235].

Таким чином, дисбіоз це, з нашого погляду, явище неоднозначне. Не виключено, що різні чинники впливають на патогенез дисбіозу. Ймовірно, в майбутньому ми зможемо не лише фіксувати дисбіотичні розлади, але й проводити, в залежності від особливостей патогенезу, адекватну його корекцію препаратами які будуть стимулювати, або, навпаки, гальмувати імунні процеси.

Якщо питання вірусно-бактеріальних взаємодій загалом вивчається доволі активно, то ідея моделювання таких інфекцій у тварин з дисбіозом є новою. Не претендуючи на вичерпність, ми вперше провели дослідження структурно-морфологічних змін у внутрішніх органах тварин при вірусних та вірусно-бактеріальних процесах, сформованих на фоні антибіотикоіндукованого дисбіозу та показали, що у тварин з дисбіозом, інфікованих ентеровірусами, крім морфологічних змін, характерних для дисбіозу, зафіксовано потужну активізацію апоптозних процесів. Ми

вважаємо доцільним поставити питання: явище апоптозу в умовах дисбіотичних порушень відіграє позитивну чи негативну роль?

Порівняльний ультраструктурний аналіз тканин печінки, селезінки та тонкого кишківника тварин з дисбіозом, інфікованих окремо сальмонелами та вірусно-бактеріальною сумішшю, дозволив зареєструвати виражені зміни в даних органах і сформулювати наукову гіпотезу, що вірусний фактор має важливе значення в патогенезі вірусно-бактеріальних інфекцій, змодельованих на фоні дисбіозу, ініціюючи зміни вже на ультраструктурному рівні. Слід відмітити, що певні зміни (спустошення білої пульпи, зменшення товщини коркового шару) в структурі селезінки мишей при дисбіозі відбуваються постійно [241]. Водночас на відміну від тварин з дисбіозом, інфікованих лише сальмонелами, а також здорових тварин, інфікованих вірусно-бактеріальною асоціацією, у мишей з дисбіозом при вірусно-бактеріальній інфекції зафіксовано специфічні зміни морфофункціонального стану органів імунної системи, зокрема в селезінці виявлено зниження об'ємної частки периартеріальних лімфоїдних муфт та збільшення частки світлих центрів лімфоїдних вузликів, а також присутність епітеліоїдноклітинних гранульом з специфічними включеннями в цитоплазмі. Крім того, одночасне введення мишам даних збудників призводить до активізації імунокомпетентних клітин селезінки, що проявлялось підвищенням кількості виявлених лімфобластів, плазматичних клітин з розширеними каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки, де, як відомо, виробляються гамма-глобуліни.

Відкритим залишається питання впливу дисбіотичних порушень на функціонування печінки. В організмі існує два основних детоксикаційні органи – печінка та мікрофлора травного тракту. Порушення взаємодії цих систем призводить до взаємних функціональних та структурних змін в них самих і організмі в цілому. Зниження детоксикаційної функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту при дисбіозі збільшує навантаження на ферментативні системи печінки і при певних умовах сприяє виникненню в ній

метаболических та структурних змін. При дисбалансі мікроекології травного тракту збільшення пропорції потенційно патогенних грамнегативних бактерій, ймовірно, призводить до накопичення в просвіті кишечника ендотоксинів, які, проникаючи через слизову оболонку кишківника в місцеву систему кровообігу, а потім через ворітну вену в печінку, викликають пошкодження гепатоцитів або потенціюють несприятливі дії інших токсикантів. Ендотоксини пошкоджують клітинні мембрани, порушують іонний транспорт, викликають фрагментацію нуклеїнових кислот, індукують утворення продуктів вільнорадикального окислення, ініціюють апоптоз і т.д. Посилене розмноження окремих видів бактерій в кишківнику при дисбіозі порушує природний механізм холестеринового гомеостазу – ентерогепатичну циркуляцію жовчних кислот, сприяючи в подальшому розвитку більшості патологічних змін в печінці і прогресуванню ліпідного дистрес синдрому [360].

Дехто з дослідників вважає, що дисбіотичні зміни в кишківнику можуть впливати на процес розвитку цирозу печінки і, відповідно, їх слід враховувати при виборі терапевтичного методу. При цьому видове співвідношення мікроорганізмів, визначене методом кросс-аналізу, пропонують використовувати в якості прогностичного фактору для оцінки ризику розвитку ускладнень [361, 362]. В цілому, ми поділяємо думку більшості авторів про те, що за такий короткий період використання антибіотиків з метою моделювання дисбіозів у тварин (5-14 днів) досягти формування виражених змін на ультраструктурному рівні доволі важко – даний орган зберігає балкову та часточкову будову, гепатоцити мають еозинофільну цитоплазму, достовірним є лише зниження числа внутрішньочасточкових лімфоцитів та неепітеліальних клітинних елементів [98].

Спираючись на отримані результати, можна зробити припущення, що на фоні дисбіозу ентеровіруси можуть бути пусковим механізмом розвитку реактивних некротичних змін генералізованого характеру у печінці, які проявляються просвітленням ядер, повним або частковим цитолізом

цитоплазми гепатоцитів, а також ущільненням і загибеллю більшості органел. Некротичні процеси в печінці, які розвиваються у дітей на фоні ентеровірусної інфекції з блискавичним перебігом та летальним закінченням, описувались і раніше [328], проте у тварин нам вдалось експериментально їх відтворити лише при моделюванні змішаної (вірусно-бактеріальної) патології і виключно на фоні штучно сформованого антибіотикоіндукованого дисбіозу.

Згідно з одержаними даними, дисбіотичні порушення на 20% збільшують летальність тварин при вірусно-бактеріальному інфікуванні та на 16,66% збільшують частоту проявів хвороби (зниження активності, млявість, тремтіння, настовбурченість шерсті, діарея), в порівнянні з контрольними тваринами, на яких проводили експеримент без формування дисбіотичних станів. Не можна виключати, що зростання чутливості мишей до ентеровірусів пов'язано з дисліпідемією, яка, як відомо, супроводжує процес дисбіозу сприяє підвищенню чутливості організму до репродукції вірусів, їх персистенції, розвитку імуносупресії, пригніченню функціональної активності макрофагів та моноцитів [327, 363, 364, 365]. При дисліпідемії антивірусний захист знижений в багато разів, у порівнянні з нормоліпідемією [363]. Крім того, дисбіози супроводжуються порушеннями з боку антиоксидантної системи, посиленням перекисного окислення ліпідів та протеолізом в слизових оболонках [360].

Сьогодні вченим вдалось показати здатність ентеровірусів збільшувати плинність мембран клітин за рахунок їх насичення ліпофільними молекулами. На моделі людських ендотеліальних клітин, інфікованих ентеровірусами ЕСНО-12 та Коксакі В-3 з використанням молекулярних флуоресцентних зондів описані зміни, які проявлялися реструктуризацією плазматичної мембрани клітин: у ліпідному шарі ендотеліоцитів зафіксовано появу ліпофільних молекул [366]. Утворюється патологічне коло: вірусна інфекція призводить до порушення метаболізму жирних кислот, що особливо виразно проявляється на фоні дисбіозу, який також індукує виснаження

поліненасичених жирних кислот, а патологічна зміна вмісту есенціальних жирних кислот сприяє розвитку вірусної інфекції [363, 367, 368].

Визначена роль вірусів в структурі дисбіотичних порушень вимагає пошуку нових підходів до корекції дисбіозу. До препаратів, які можуть бути перспективними в цьому плані, можна віднести сорбенти. Ентеросорбція є неінвазивним методом еферентної терапії і при виборі адекватного сорбенту може сприяти ефективному очищенню організму від алергенів, медіаторів, продуктів алергічної або запальної реакції, метаболітів, токсинів, вірусів та інших компонентів. Оздоровлення біотопів здатне оптимізувати умови для функціонування нормальної мікрофлори людини [369, 370, 371]. Однак не всі ентеросорбенти можуть бути використані при дисбіозах, оскільки деякі з них здатні зв'язувати клітини кишкового мікробіому та поглиблювати мікроекологічні порушення [91, 92, 164]. За нашими даними, сорбенти на основі бентоніту та гідрогелю метилкремнієвої кислоти, які здатні активно сорбувати кишкові віруси, не наділені ні бактерицидною, ні бактеріостатичною функцією по відношенню до більшості видів досліджених мікроорганізмів бактеріальної природи. Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників, які вивчали антибактеріальні властивості монтморилонітвмісних сорбентів [115]. Водночас слід відмітити, що при тривалому часі контакту обидва досліджувані сорбенти можуть зв'язувати бактерії. В більшій мірі такі властивості виражені у «Ентеросгелю», який, в залежності від виду мікроорганізмів, може зв'язувати від 52 до 90% клітин. Показники сорбційної активності та міцність зв'язку мікроорганізмів зі бентонітом не такі помітні і, очевидно, його використання не буде супроводжуватись зміною складу кишкової мікрофлори.

Ймовірно, головними чинниками лікувальної дії смектитів є абсорбуючі та іонообмінні властивості, які дозволяють зв'язувати і виводити з організму токсини, газу, іони важких металів та радіонуклідів, не зачіпаючи при цьому клітини індигенної мікробіоти. Більш того, деякі дослідники повідомляють про позитивний вплив бентоніту на стан кишкового мікробіому у тварин [118].

За їх даними, пероральне введення тваринам бентоніту сприяє значному зниженню рівня потенційно-патогенних мікроорганізмів (*Gallibacterium anatis*, *Clostridium aldenense*, *Bacteroides dorei*, *Helicobacter pullorum*, *Campylobacter jejuni*). Описано також виражену лікувальну та профілактичну дію даного сорбенту відносно кишково-шлункових захворювань у тварин [119].

Використання у мишей вдосконаленої нами форми бентоніту з контрольованим катіонним заміщенням дозволило отримати зниження тривалості виділення вірусів поліомієліту у тварин з антибіотикоіндукованим дисбіозом. Дещо меншою мірою такі висновки можна зробити і про сорбент на основі гідрогелю метилкремнієвої кислоти. Разом з тим, в даному випадку є важливим не лише тривалість виділення ентеровірусів у тварин з дисбіозом, а й показники їх інфекційних титрів. Результати наших експериментальних досліджень доводять здатність сорбентів сприяти зниженню концентрації ентеровірусів у фекаліях тварин з дисбіозом кишківника при його використанні на фоні антибіотикотерапії, що відкриває перспективи для розробки ефективних комплексних методів лікування хворих з вірусними інфекціями.

Однозначно, оцінка ефективності дії «вірусних» сорбентів з метою регуляції мікробіоценозу кишківника не може бути якісною без вивчення їх загального впливу на деякі фізіологічні показники організму тварин: аналізу зовнішнього вигляду, тривалості життя та деяких інших функцій тварин. Наші дослідження показали, що постійне вживання гелю бентоніту не призводило до надмірного збільшення ваги у тварин, тобто він не повинен розглядатися як можливий чинник у розвитку абдомінального ожиріння. У продовж всього періоду спостереження смертність серед тварин контрольної групи була вищою, а тривалість життя меншою ніж у дослідної групи тварин [342]. Зменшення смертності серед тварин при постійному введенні сорбенту, очевидно, можна пов'язати з високими сорбційними та іонообмінними властивостями бентоніту, який здатний зв'язувати та виводити із організму

різні токсичні речовини. Це сприяє зміцненню природної системи захисту організму та підтриманню гомеостазу. Подовження життя у тварин після вживання бентоніту також пояснюють формуванням аутоінтоксикаційного імунітету, який формується після кишкової детоксикації (ентеросорбції) [106]. Такі підходи сьогодні широко вивчаються з позиції геронтології. Цікаво, що народжуваність у тварин, що вживали бентоніт, була більшою, у порівнянні із контрольною групою. Це свідчить про позитивний вплив бентоніту на репродуктивну активність лабораторних тварин. Для пояснення ефекту підвищення плідності мишей при вживанні гелю бентоніту потрібні додаткові дослідження. Одним із вірогідних факторів може бути оздоровлення ним мікробіому, який впливає на безліч фізіологічних функцій, у тому числі на репродуктивність. Не виключено, що бентоніт, збагачуючи організм мишей окремими есенціальними мінеральними елементами (кремнієм та ін.).

В цілому, на наш погляд, в умовах зростання рівня резистентності до антибактеріальних засобів, включення ентеросорбентів в комплексну терапію дисбіозу є важливим та патогенетично обґрунтованим підходом.

Сьогодні найбільш поширеним методом оцінки ефективності препаратів для корекції дисбіозу (пробіотиків, сорбентів) залишається мікробіологічний метод. Разом з тим, він не дозволяє в повній мірі провести аналіз дії цих препаратів на макроорганізм без вивчення ультраструктурних змін у внутрішніх органах тварин, що відбуваються при таких порушеннях.

Нами показано, що в слизовій оболонці тонкої кишки мишей після використання живих мультипробіотичних препаратів на основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* відмічалось згасання проявів цитодеструктивних порушень. Разом з тим, отримані результати дозволяють зробити припущення про здатність пробіотичних препаратів при одночасному введенні в організм тварин з комплексом антибіотиків стимулювати імунну відповідь організму та зменшувати прояви анафілаксії, про що свідчить зменшення кількості еозинофілів і базофілів. Такі результати узгоджуються з даними інших

дослідників, які повідомляють про виражений ефект пробіотиків в профілактиці структурно-морфологічних змін у кишківнику [372].

Крім цього, нами встановлено зменшення глибини цитодеструктивних порушень в кишківнику тварин після використання живих мультипробіотиків в процесі моделювання дисбіотичних станів у мишей, інфікованих вірусами Коксакі В. Ми не можемо стверджувати, що введені мишам пробіотичні штами колонізували кишківник, хоча й не виключаємо можливість пробіотиків активно виділяти метаболіти при проходженні через шлунково-кишковий тракт. Останні здатні позитивно впливати на бар'єрну функцію кишківника. Порівнюючи з пробіотиками, профілактичний ефект бентоніту з позиції профілактики структурно-морфологічних порушень був менш помітним, хоча, безсумнівно – його можна сміливо відносити до тих речовин, які сприяють зменшенню прояву цитодеструктивних змін в тонкому кишківнику при дисбіозі та нормалізації імунних реакцій організму, які супроводжують розвиток таких порушень.

Встановлено також виражений профілактичний ефект пробіотичних препаратів, який проявляється зменшенням цитодеструктивних ознак дисбіозу в кишківнику тварин, інфікованих Коксакі В3 та *Salmonella typhimurium*. Не виключено, що це може бути пов'язано з їх здатністю до нормалізації ліпідного обміну, оскільки сьогодні до ліпідмодулюючих патогенів, поряд з вірусами герпесу, віднесені також і ентеровіруси [373, 374, 375]. Припускають, що віруси здатні запускати каскад взаємозалежних процесів, які супроводжуються пошкодженням мембран ендотеліоцитів, порушенням обміну та транспорту поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), розвитком запальних та імунопатологічних процесів. Водночас, дисліпопротеїнемія сприяє підвищенню чутливості інфікованих тварин до репродукції вірусів, їх тривалої персистенції, розвитку імуносупресії тощо [376]. Сьогодні обговорюється питання використання пробіотиків в складі комбінованої терапії для лікування дисліпідемії не лише при вірусних чи вірусно-бактеріальних інфекціях, а й при іншій соматичній патології [376].

Водночас пробіотики в процесі моделювання вірусно-бактеріальних інфекцій на фоні дисбіозу суттєво не впливали на структуру селезінки – серед клітин селезінки інколи реєстрували апоптозно змінені клітини та апоптозні тільця. Дехто вважає, що для селезінки це є нормою, оскільки у ній постійно обновлюються клітини лімфоцитарного ряду. Залишкові тільця поглинаються макрофагами з подальшим їх розщепленням. Після використання живих мультипробіотичних препаратів основі *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *lactococcus*, *Propionibacterium* та *Acetobacter* в клітинах печінки тварин з дисбіозом, інфікованих ентеровірусами та сальмонелами, відмічалась певна нормалізація, проте спостерігались і неспецифічні зміни, які, ймовірно, свідчили про активацію запальних процесів у даному органі.

За нашими даними, використання гелевої форми сорбенту бентоніту мишей з дисбіозом сприяє частковому відновленню ультраструктури кишківника, що супроводжувалось зменшенням кількості десквамованих мікроворсинок, згладженістю плазматичної мембрани та дистрофічними змінами у власній пластинці слизової оболонки та підслизовій основі кишківника. Водночас в окремих ентероцитах все ж таки продовжували розвиватись апоптозні зміни зі зміщенням клітин до базальної мембрани, ущільненням цитоплазми і органел, а також формуванням передаптозних та апоптозних тілець. Після використання гелевої форми бентоніту в процесі моделювання дисбіозу у мишей, інфікованих вірусно-бактеріальною сумішшю, відмічалось зменшення глибини порушень на рівні ультраструктурної організації кишківника, проте вони були не такі виражені, порівнюючи з профілактичним ефектом пробіотичних препаратів. Слід відмітити, що локальні апоптозні процеси, які супроводжувались ущільненням ядер, торкались і плазмоцитарних клітин. Разом з тим, показано, що монтморилоніт бентоніт в цілому зберігає ультраструктурну організацію селезінки. Водночас встановлено, що у печінці мишей, інфікованих вірусно-бактеріальною сумішшю, після використання сорбенту виявлені мінімальні зміни ультраструктур, що свідчили про незначне порушення метаболізму

цього органу. Важливо, що після використання гелевої форми бентоніту не було зафіксовано некротичних змін, які проявлялись просвітленням ядер клітин, які, як відомо, є результатом порушення співвідношення еу- та гетерохроматину, не відмічалось також цитолізу гепатоцитів, масової загибелі органел, зокрема мітохондрій, які в контролі ущільнювались і підлягали лізису, а також деструктивних змін каналців гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки та втрати рибосом.

Отже, не зважаючи на те, що використання гелевої форми бентоніту в процесі моделювання дисбіотичних станів у мишей мало впливало на мікробіологічні показники дисбіозу, у даних препаратів встановлено наявність гепатопротекторних властивостей. Очевидно, ентеросорбенти сприяють вилученню, фіксації та видаленню з шлунково-кишкового тракту бактеріальних токсинів, продуктів природного обміну у високих концентраціях, активованих ферментів, медіаторів запалення, біологічно-активних речовин, умовно-патогенних мікроорганізмів, вірусів тощо. В даному випадку гепатопротекторний ефект бентоніту можна також пояснити його здатністю зв'язувати жовчні кислоти і холестерин. Це, очевидно, є одним з чинників, які сприяють відновленню фізіологічної ентерогепатичної циркуляції жовчних кислот і зниженню їх цитотоксичної дії на слизову оболонку, а також нормалізації обміну холестерину [111]. Не виключено що в даному процесі важливу роль відіграє кремній, який підвищує еластичність стінок судин і попереджає формування на них відкладень холестеринів [112].

Профілактичний ефект бентоніту можна також пояснити тим, що він являється природним полікомпонентним комплексом мінералів. Багато елементів, що містяться в ньому, відносяться до групи глинистих мінералів, які беруть участь у ряді життєвих процесів в складі ферментів, гормонів, вітамінів та ін. Кристалічна структура бентоніту являє собою стабільну «решітку», яка включає кремній, кисень, алюміній, з домішками великого набору мінеральних елементів, які можуть легко вступати в обмінні реакції з хімічними речовинами, присутніми в шлунково-кишковому тракті. Оскільки

ці елементи дуже слабо пов'язані з основною решіткою мінералу, вони при надходженні мінералу в організм *per os* можуть легко відділятися і, якщо в організмі існує дефіцит цих елементів, ним використовуватися. Вільні ж зв'язки мінералу, імовірно, заміщаються тими елементами, яких в організмі міститься в надлишку. Далі мінерал із заміщеними іонами виводиться через шлунково-кишковий тракт з організму. Таким чином, використання смектитів може попереджувати порушення мінерального обміну, яке відіграє важливу патогенетичну роль у розвитку цілої низки патологічних процесів [116, 117].

Ми не виключаємо також можливість взаємодії гелю бентоніту із мікробіомом травного тракту, який виконує безліч функцій, що забезпечують гомеостатичний стан організму в цілому. Зокрема, мікробіом захищає організм від шкідливих мікробів і сполук, спричиняє істотний вплив на структурно-функціональний стан внутрішніх органів, імунної системи і процеси регуляції життєво важливих функцій, а також сприяє гармонійним взаємодіям макроорганізму з екзогенним мікробним світом. Тому оздоровлення мікробіому може бути одним із пояснень отриманих нами результатів.

Не виключено також, що дрібнодисперсна структура і здатність формувати гелі надають смектитам цитомукопротекторні властивості, які сприяють оздоровленню мікробіомної системи та слизових оболонок організму. Ймовірно, існують й інші механізми протективної дії сорбентів при дисбіотичних процесах, що сформовані еволюційно, але вони ще недостатньо вивчені. Безсумнівно, шлунково-кишковий тракт є середовищем для однієї з найскладніших мікробних екосистем, і дослідження в даному напрямку відкривають нові можливості для лікування інфекційних захворювань.

Отже, роль ентеровірусів в структурі дисбіотичних розладів виявилась набагато глибшою, ніж вважали раніше. Їх кількість зростає при дисбіотичних порушеннях, в ентеровірусних ізолятах, отриманих від таких хворих, частіше реєструються позитивні генетичні маркери вірулентності та вища здатність до виживання. Ентеровірусний фактор здатний поглиблювати структурно-морфологічні зміни в кишківнику особливо на фоні дисбіозу. Очевидно,

механізми взаємодії ентеровірусів з кишковим мікробіомом є значно складнішими, ніж уявляли дотепер. Разом з тим, не виключено, що стрімкий прогрес у вірусологічній науці та суміжних дисциплінах, насамперед у молекулярній біології найближчими роками дозволить визначити значення присутніх величезних популяцій вірусів в кишківнику людини, і можливо, що деякі з них можна буде розглядати з позиції комменсалів.

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 вірусомісного матеріалу з низьким титром ($-\log TCD_{50}/\text{мл}$ 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 бактеріальні і вірусні інфекційні патогени. 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 і 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.

Обгрунтовано доцільність одночасного визначення як ентеровірусного геному в матеріалі, отриманому від осіб з дисбіозом, так і виділення вірусних інфекційних агентів на культурах клітин. Крім того, 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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Янковский Д. С., Ширококов В. П., Дымент Г. С. Микробиом. К. 2018. 640 с. ISBN 966-8607-08-02.
2. Ширококов В. П., Янковский Д. С. Дымент Г. С. Микробиом человека и современные методы его оздоровления. Журнал НАМН Украины. 2013. т. 19. № 4. С. 411-420.
3. Янковський Д. С., Ширококов В. П., Димент Г. С. Мікробіом у фізіології людини. Інфекційні хвороби. 3(93). 2018. С. 5-17. DOI 10.11603/1681-2727.2018.3.9407.
4. Yatsunenکو T, Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature. 2012 May 9 [cited 2019 Jan 13]; 486(7402):222–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11053>. DOI: 10.1038/nature11053.
5. Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Мікробіом та старіння людини (огляд літератури). Журнал НАМН України. 2019. т. 25 . № 4 . С. 463–75.
6. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. Fields' Virology, 5th . Lippincott-Williams. Philadelphia. 2007. P. 89
7. Virgin H. W. The virome in mammalian physiology and disease. Cell. 157: 142–150. doi 10.1016/j.cell.2014.02.032.
8. Dennis Carroll et al. The Global Virome Project. Science. 2018. DOI: 10.1126/science.aap.7463.
9. Banyai K., Jakab K., Reuter G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak . Archives of Virology. 2003. Vol. 148. № 12. P. 2281-2291.
10. Smits L., Osterhaus M. E. Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. Journal of Clinical Microbiology. 2010. Vol. 48. № 5. P. 1787-1794.

11. Cadwell K. Expanding the Role of the Virome: Commensalism in the Gut. *Journal of Virology*. 2015. Vol. 89. № 4. P. 1951-1953.
12. Garrett, W. S., Gordon J. I., Glimcher L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010. Vol. 140 (6). P. 859–70.
13. Barton E. S., Bryan E., Daniel H. E. Utilization of sialic acid as a coreceptor is required for reovirus-induced biliary disease. *Dermody J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 111 (12). P. 1823–1833.
14. Sharon S. K. Best G. T., Etheredge C. A. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*. 2011. Vol. 334. P. 249–52.
15. Бондаренко В. М., Мацулевич Т. В. Дисбактериоз кишечника, как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М. 2007.
16. Циммерман Я. С. Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии. *Клиническая медицина*. №1. 2013. С. 5-11.
17. Lederberg J., McCray A. T. ‘Ome sweet ‘omics – A genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001. N 15(7). P. 8.
18. Ткач С. М., Пучков К. С. Роль пробиотиков в коррекции нарушений кишечной микробиоты. *Сучасна гастроентерологія*. № 3 (77) . 2014. С. 59-65.
19. Широбоков В. П., Янковский Д. С. Дымент Г. С. Микробная экологическая система человека: современная концепция: зб. праць науково-практичної конференції «Мікробна екологія людини. Сучасні стратегії використання пробіотиків». Київ. 2011. С. 2-15.
20. Вернадский В. И. Живое вещество. М.: Мир. 1978.
21. Волошин С. А. Значение межклеточных взаимодействий у бактерий *Micrococcus luteus* и *Rhodococcus rhodochrous* для инициации роста. Автореф. дис....канд.биол.наук. М. 2005. 25 с.
22. Underwood M.A. Intestinal dysbiosis: Novel mechanisms by which gut microbes trigger and prevent disease. *Prev. Med.* 2014. Vol. 65, 133-137.
23. Черешнев В. А., Морова А. А., Рямзина И. Н. Биологические законы и жизнедеятельность человека. Россия—Чехия. 2000.

24. Macfarlane G. T., Macfarlane S. Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol.* 1997. Vol. 32 (Suppl. 222). P. 3-9.

25. Циммерман Я. С., Субботина Л. В., Несчисляев В. А. Микробный антагонизм и обоснование включения пробиотиков в комплексное лечение *Helicobacter pylori*-зависимых заболеваний. *Клин. мед.* 2010. № 4. С. 35-42.

26. Бабин В. Н., Минушкин О. Н., Дубинин А. В. и др. Молекулярные аспекты симбиоза в системе «хозяин—микрофлора». *Российск. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* 1998. № 6. С. 76-82.

27. Шендеров Б. А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека. *Российск. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* 1999. № 1. С. 61-65.

28. Hill M. G., ed. *Microbial metabolism in the digestive tract.* New York. 1983.

29. Thornton G., O'Sullivan M., O'Sullivan D. et al. Human intestinal probiotic bacteria – production of antimicrobial factors. *Ir. J. Med. Sci.* 1993. Vol. 162 (9). P. 366-369.

30. Tannock G. W. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. Vol. 73 (Suppl.). P. 410-414.

31. Ильина Н. О., Мазанкова Л. И., Кондракова О. А., Затевалов А. М. Метаболические критерии дисбактериоза кишечника при острых кишечных инфекциях у детей. *Consilium Medicum. Прил.: Гастроэнтерология.* 2005. №1. С. 32-38.

32. Циммерман Я. С. О сущности понятия «дисбактериоз» (дисбиоз) кишечника и правомерности использования этого термина. *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол.* 2000. № 1. С. 81-84.

33. Шендеров Б. А. *Медицинская микробиология и функциональное питание.* М. 1998.

34. Marchesi J. R., Adams D. H., Fava F et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 2016. Vol. 65. 330–339.
35. Lei Y. M., Nair L., Alegre . L. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. *Clin Res Hepatol Gas*. 2015. Vol. 39. P. 9-19.
36. Jorge Cervante The gut–lung axis in tuberculosis. *Pathogens and Disease*. 2017. Vol. 75 (8). P. 1 – 3.
37. Уголев А. М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л. : Наука, 1985. 544 с.
38. Уголев А. М. Физиология и патология пристеночного (контактного) пищеварения. Л. 1967.
39. Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Мікробіом та старіння людини (огляд літератури). *Журнал НАМН України*. 2019. Т. 25. № 4. С. 463–75. DOI: 10.37621/JNAMSU-2019-4-463-475.
40. The Human Microbiome Project Consortium A framework for human microbiome research. *Nature*. 2012. Vol. 486. P. 215–221.
41. Barko P. C., McMichael M. A., Swanson K. S., Williams D. A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med*. 2018. №32(1). P. 9–25.
42. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacol Res*. 2012. Vol. 7. 1023–1029.
43. Marzetti E., Calvani R., Tosato M., Cesari M. et al. Sarcopenia: an overview. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2017. №29(1). P. 11–17.
44. McNally L., Brown S. P. Building the microbiome in health and disease: niche construction and social conflict in bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 201. № 370(1675).
45. Nagpal R., Mainali R., Ahmadi S., Wang S. et al. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*. 2018. № 4(4). P. 267–85.
46. Seidel J., Valenzano D. R. The role of the gut microbiome during host ageing. *F1000 Res*. 2018. № 7. pii: F1000 Faculty Rev-1086.

47. Tremaroli V., Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012, Sep 13. Vol. 489 (7415). P. 242–9.

48. Бондаренко В. М., Боев Б. В., Лыкова Е. А., Воробьев А. А. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта. *Российск. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* 1998. № 1. С. 66-70.

49. Николаева Т. Н., Зорина В. В., Бондаренко В. М. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной лактофлоры кишечника. *Экспер. и клин. гастроэнтерол.* 2004. № 4. С. 39-42.

50. Хавкин А. И., Бельмер С. В. Микроэкология кишечника: методы неспецифической коррекции. *Детск. гастроэнтерол. и нутрициол.* 2003. № 11 (13). С. 772-775.

51. Falony G., Joossens M., Vieira-Silva S., Wang J. et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. 2016. V. 352(6285). P. 560-564.

52. Dethlefsen, L. & Relman, D. A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. № 108. P. 4554–4561.

53. Shirobokov V. P., Yanovskiy D. S., Dyiment G. S. *Microbes v biogeohimicheskikh protsessah, evolyutsii biosferyi i suschestvovanii chelovechestva*. K. 2014. 464 s.

54. Mahony J., Lugli G. A., Douwe van Sinderen, Ventura M. Impact of gut-associated bifidobacteria and their phages on health: two sides of the same coin? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 102. С. 2091–2099.

55. Chassard C., Dapoigny M., Scott K. P., Crouzet L. et al. Bernalier-Donadille A Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018. Vol. 35(7). P. 828–838.

56. Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H. et al. Komuro I Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota

of patients with heart failure. PLoS One 2017. Vol. 12(3): e0174099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174099>

57. Million M., Maraninchi M., Henry M., Armougom F., Richet H. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. Int J Obes. 2012. Vol. 36(6). P. 817–825.

58. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава России № 231 от 09.06.03. (Отраслевой стандарт).

59. Циммерман Я. С. Дисбиоз («дисбактериоз») кишечника и/или «синдром избыточного бактериального роста». Клин. мед. 2005. № 4. С. 14-22.

60. Златкина А. Р. Современные подходы к коррекции дисбиоза кишечника. Российск. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. 1999. №3. С. 64-67.

61. Барышникова Н. В., Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П. Синдромы избыточного бактериального роста (дисбиоза) в тонкой кишке и дисбиоза толстой кишки. Вестн. клуба панкреатол. 2009. № 1. С. 86-90.

62. Митрохин С. Д. Дисбактериоз: современный взгляд на проблему. Инфекции и антимикроб. тер. 2000. № 5. С. 15-17.

63. ЗУ от 21.02.2006 № 3447-IV «Про защиту животных от жестокого обращения»: 2006.

64. Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микрофлора и здоровье человека. К.: Червона Рута-Турс. 2008. 552 с.

65. Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009. Vol. 53 (12). P. 5046-54.

66. Ткач С. М., Пучков К. С. Кишечная микробиота в норме и при патологии. Современные подходы к диагностике и коррекции кишечного дисбиоза. К.: Твиса ЛТД. 2014. 149 с.

67. Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С, Мікробна екологія людини з кольоровим атласом. Навчальний посібник. К.:ТОВ «Червона рута - Турс». 2010. 312 с.

68. Смирнов С. Г. Этология бактерий. Вестник Ивановской медицинской академии. 2006. Том: 11. № 3-4. С. 83-86.

69. Сидоренко С. В. Продукция токсина Шига штаммами *Escherichia Coli* и антибиотики. Антибиотики и химиотер. 2001. Т46. №5. С. 3-5.

70. Крамарев С. А., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Антибиотико-ассоциированные диареи у детей с инфекционными заболеваниями и возможности их профилактики. Современная педиатрия. 2007. № 4. С. 157-161.

71. Степанов Ю. М., Бойко Т. Й. Дисбіоз кишечника та ефективність використання пробіотика-біоентеросептика Ентерожерміна в його корекції (методичні рекомендації). Гастроентерологія. 2016. №3 (61). С. 73-79.

72. Medical microbiology, virology, immunology= Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: a textbook for English-speaking students of higher medical schools translations from ukr. Published / [T.V. Andrianova, V.V.Bobyr, etc.] ; Ed. by V.P. Shyrobokov. – Vinnytsia: Nova Knyha, 2019.-744 p. ill. . - ISBN 978-966-382-800-8.

73. 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.

74. 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).

75. Дисбиозы и современные подходы к их профилактике / Д. С. Янковский, В. П. Ширококов, Р. А. Моисеенко, А. П. Волосовец, С. П. Кривоустов, Г. С. Дымент. Современная педиатрия. 2010. № 3. С. 143-151.

76. Янковский Д. С., Ширококов В. П., Дымент Г. С. Создание новых комплексных препаратов на основе биомассы пробиотических бактерий и геля смектита. Профілактична медицина. 2013. № 3–4 (21). С. 108-115.

77. Янковський Д. С., Ширококов В. П., Димент Г. С. Інноваційні технології оздоровлення мікробіому людини. Nauka innov. 2018, 14 (6). С. 5-16.

78. Blaser M. J. The microbiome revolution. J Clin Invest. 2014 Oct [cited 2016 May 14]. V. 124(10). P. 4162–5.

79. Rózsa L, Apari P, Müller V. The microbiome mutiny hypothesis: can our microbiome turn against us when we are old or seriously ill? Biol Direct [Internet]. 2015 Jan 14 [cited 2019 Feb 15]. V. 10(1). P. 3.

80. Mackowiak P. A. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. Front Public Health. 2013 Nov 13 [cited 2019 Feb 9]. V. 1. P. 52.

81. Flin H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2012. № 9. P. 577-589.

82. Hartel B. Molecular and cellular mechanisms of intrinsic aging and photoaging (cellular stressors, defense mechanisms). SOFT-Journal. 1999. V 8. P. 33-42.

83. Thomas C., Versalovic J. Probiotics-host communication: modulation of signaling pathways in the intestine. Gut Microbes. 2010. № 1. P. 148–163.

84. Van Tassell M. L., Miller M. J. Lactobacillus Adhesion to Mucus. Nutrients. 2011. № 3(5). P. 613–636.

85. Ringel Y., Quigley E., Lin H. Probiotics and gastrointestinal disorders. Am. J. Gastroenterol. 2012. Suppl. 1. P. 34-40.

86. Young V. B., Schmidt T. M. Overview of the gastrointestinal microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. N 635. P. 29-40.

87. Янковский Д. С., Ширококов В. П., Дымент Г. С. Интегральная роль симбиотической микрофлоры в физиологии человека. К.: Червона Рута-Турс. 2011. 169 с.

88. Brenner D. M., Moeller M. J., Chey W. D. et al. The utility of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* 2009. Vol. 104. P. 1033-1049.

89. Hungin A. P., Mulligan C., Pot B. Systematic review: Probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice — an evidence-based international guide. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2013. N 38. P. 864-886.

90. Moayyedi P., Ford A. C., Talley N. J. et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review. *Gut.* 2010. Vol. 59. P. 325-332.

91. Новокшенов А. А., Соколова Н. В. Метод энтеросорбции и его клиническая эффективность в комплексной терапии ОКИ у детей. *Вопросы современной педиатрии.* Т. 10. №1. С. 140-147.

92. Новое поколение энтеросорбентов и комплексных пробиотиков для оздоровления микробной экосистемы человека / Д. С. Янковский, В. П. Ширококов, Р. А. Моисеенко, С. П. Кривопустов, Г. С. Дымент. *Современная педиатрия.* 2013. № 6(54). С. 93-101

93. Ширококов В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Новые стратегии в области создания и клинического использования пробиотиков. *Вісник фармакологі та фармації.* 2010. №2. С.18-30.

94. Jones M. L., Tomaro-Duchesneau C., Martoni C.J, Prakash S. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase –active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical, evidence, and future direction for heart health application. *Expert Opin Biol Ther.* 2013. Jan 28.

95. Sommer F., Backhed F. The gut microbiota – master of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013. №11(4). P. 227-238.

96. Agerholm-Larsen L., Raben A., Haulrik N., et al. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factor cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr.* 2000. № 54. P. 288-297.

97. Современные возможности профилактики дисбиозов у детей и взрослых / Д. С. Янковский, В. П. Ширококов, Р. А. Моисеенко, А. П. Волосовец, С. П. Кривопустов, Г. С. Дымент. *Профілактична медицина.* 2010. №4. С. 69-76.

98. Овчарова А. Н. Морфологическая характеристика тонкой и толстой кишки при экспериментальном первичном дисбиозе и его коррекции пробиотиками: автореферат дис... канд. биол. наук: 03.03.04. Научно-иссл. институт морфологии человека. Москва., РАМ. 2012. С. 24.

99. Lo Vecchio A. Cohen M.B. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: benefits and barriers . *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2014. №30. P. 47-53.

100. Wang Y., Kasper L.H. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav. Immun.* 2014. №38. P. 1-12.

101. Vrieze A., de Groot P.F., Kootte R.S., Knaapen M. et al. Nieuwdorp M. Fecal transplant a safe and sustain-able clinical therapy for restoring intestinal microbialbalance in human disease? *Best. Pract. Res. Clin Gastroenterol.* 2013. №27. P. 127-137.

102. Новокшенов А. А., Соколова Н. В., Ларина Т. С., Бережкова Т. В. Роль энтеросорбентов в составе комплексной терапии острых кишечных инфекций у детей. *Практика педиатра.* 2008. №5 С. 20–26.

103. Новокшенов А. А. Учайкин В. Ф., Соколова Н. В. Роль иммуномодулятора Гепон в комплексной терапии ОКИ у детей. *Лечащий врач.* 2003. № 6. С. 76-79.

104. Горчакова Н. О., Чекман І. С., Бабак В. В. та ін. Вивчення фармакологічної активності та безпечності препарату Ентеросгель. *Мистецтво лікування.* 2005. № 4. С. 76–77.

105. Гебеш В. В., Сухов Ю. А., Голуб А. П. Влияние препарата Энтеросгель на уровень провоспалительных цитокинов при лечении больных острыми кишечными инфекциями и корью. Клиническая иммунология. 2007. № 1(6). С. 76-78.
106. Фролькис В. В., Мурадян Х. К. Экспериментальные пути продления жизни. Л.: Наука, 1988. С. 248.
107. Eckardt A. J., Baumgart D. C. Viral gastroenteritis in adults. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. 2011. Vol. 6. № 1. P. 54–63.
108. Frolkis V. V. Vliyanie enterosorbtsii na signalyi EPR pecheni kryis raznogo vozrasta. *Vopr. med. himii*. 1986. T. 32. № 3. P. 80.
109. Воробьев А. А., Гершанович М. Л., Петров Л. Н. Предпосылки и перспективы применения пробиотиков в комплексной терапии онкологических больных. *Вопросы онкологии*. 2004. №3. С. 361-365.
110. Томчук В. А. Ентеросорбенти, їх властивості та застосування. *Біологія тварин*. 2014. т. 16. № 1. С. 148-159.
111. Ширококов В. П. Янковский Д. С. Дымент Г. С. Перспективы использования бентонита при создании нового вида мультипробиотиков. *Современная педиатрия*. 2008. №4(21). С. 143-154.
112. Кузнецов В. Н. Литофагия. *Биология*. 2001. № 5. С.1-8.
113. Джамалдинов А. Ч., Нарижный А. Г., Крейндлима Н. И. Влияние введения в рацион хряков кремнийорганических энтеросорбентов на их воспроизводительную функцию. *Доповідь на Scientific research and their practical application. modern state and ways of development '2013. SWorld*. 1-12 October. 2013.
114. Нарижный А. Г., Лужных Л. Ю., Ескин Г. В., Кропачев Н. А. Влияние скармливания энтеросорбентов на воспроизводительные способности свиней. *Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин та Держ. н.-д. контрол. інституту ветпрепаратів та корм. добавок*. 2008. Вип. 9, № 3. С. 307-314.

115. Антибактериальные свойства монтмориллонит содержащих сорбентов/ В.Д. Буханов, А.И. Везенцев, Н.Ф. Пономарева, Л.А. Козубова, С.В. Королькова, Н.А. Воловичева, В.А. Перистый // Научные ведомости. Серия Естественные науки. 2011. № 21 (116). Выпуск 17. С. 57-63.

116. Широбоков В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Світ глини і здоров'я людини. Світогляд. 2012. №2 (34). С. 6-17.

117. Широбоков В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. На зорі зародження життя: роль глинистих мінералів. Світогляд. 2013. №1 (39). С. 58-65

118. Tanka P. Prasai, Kerry B. Walsh. Biochar, Bentonite and Zeolite Supplemented Feeding of Layer Chickens Alters Intestinal Microbiota and Reduces Campylobacter Load. PLoS ONE 11(4): e0154061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154061>.

119. Семененко М. П. Фармакология и применение бентонитов в ветеринарии. Автореф. дис. доктора. ветер. наук. Краснодар. 2008. № 48. С. 30.

120. Патент № 42906 Україна (корисна модель). А61К 35/66, А23С 9/12, С12N 1/20. Заявл. 04.03.2009. Спосіб культивування анаеробних бактерій / Д. С. Янковський, В. П. Широбоков, Г. С. Димент. Патент № 42906 Україна (корисна модель).

121. Широбоков В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Паралельні світи перетинаються. Світогляд. 2010. №5(25). С. 18–28.

122. Qin J. A. human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010. Vol. 464. P. 59–65.

123. Виром человека/ Д. С. Янковский, Г. С. Дымент, В. В. Бережной, В. О. Китап, Н. В. Химич. Современная педиатрия. №1 (97). 2019. С. 49-74.

124. Reese T. A, Wakeman B. S., Choi H. S., Hufford M. M. Helminth infection reactivates latent γ -herpesvirus via cytokine competition at a viral promoter. Science. Vol. 2014. 345 (6196). P. 573–577. doi 10.1126/science.1254517.

125. Carding S. R., Davis N, Hoyles L. Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017. V. 46(9). P. 800–815. doi 10.1111/apt.14280. Epub 2017 Sep 4.

126. Minot S., Sinha R., Chen J., Li H The human gut virome: Interrindividual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 2011. V. 21(10). P. 1616–1625. doi 10.1101/gr.122705.111. Epub 2011 Aug 31.

127. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? / P. Lepage, J. Colombet, P. Marteau, T. Sime-Ngando, J. Dore and M. Leclerc. *Gut.* 2008. Vol. 57. № 3. P. 424–425.

128. Dalmasso M., Hill C., Ross R. P. Exploiting gut bacteriophage for human health. *Trends Microbiol.* 2014. V. 22. P. 399–405. doi 10.1016/j.tim.2014.02.010. Epub 2014 Mar 20.

129. Dutilh B. E., Cassman N., McNair K., Sanchez S. E. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communications.* 2014. № 5. P. 4498–4512. doi 10.1038/ncomms5498.

130. Ogilvie L. A., Bowler L. D., Caplin J. Genome signature based dissection of human gut metagenomes to extract subliminal viral sequences. *Nat. Commun.* 2013. № 4. 2420 p. doi 10.1038/ncomms3420.

131. Ackermann H. W. Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology.* 2009. Vol. 501. P. 127–140.

132. Reyes A., Haynes M., Hanson N. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature.* 2010. Vol. 466. № 7304. P. 334–338.

133. Castroo Mejia J. L., Muhammed M. K., Kot W., Neve H. Optimizing protocols for extraction of bacteriophages prior to metagenomic analyses of phage communities in the human gut. *Microbiome.* 2015. Vol. 3. P. 64. doi 10.1186/s4016880155013114.

134. Hoyles L., Mc Cartney A. L., Neve H., Gibson G. R. Characterization of viruslike particles associated with the human faecal and caecal microbiota. *Res. Microbiol.* 165: 8033812. doi 10.1016/j.resmic. 2014.10.006. Epub 2014 Oct 22.

135. Breitbart M., Haynes M., Kelley S. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Research in Microbiology*. 2008. Vol. 159. № 5. P. 367–373.

136. Rohwer F. Global phage diversity. *Cell*. 2003. Vol. 113. № 2. P. 141.

137. Duerkop B. A., Clements C. V., Rollins D. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109. № 43. P. 17621–17626.

138. Minot S., Bryson A., Chehoud C. Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. Vol. 110. № 30. P. 12450–12455.

139. Barr J. J., Auro R., Furlan M., Whiteson K. L. et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110 (26). P. 234-236.

140. Delwart E. A roadmap to the human virome. *PLoS Pathog.* 2013. № 9. doi 10.1371/journal.ppat.1003146. Epub 2013 Feb 14.

141. De Vlaminc I., Khush K. K., Strehl C., Kohli B. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013. № 155. P. 1178–1187. doi 10.1016/j.cell.2013.10.034.

142. Stelekati E., Wherry E. J. Chronic bystander infections and immunity to unrelated antigens. *Cell Host and Microbe*. 2012. Vol. 12. № 4. P. 458–469.

143. Roossinck M. J. Move over bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *J. Virol.* 2015. Vol. 89(13). P. 6532–6535. doi 10.1128/JVI.02974–14.

144. Roossinck M. J. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. № 9. P. 99–108. doi 10.1038/nrmicro2491. Epub 2011 Jan 4.

145. Minot S., Sinha R., Chen J. The human gut virome: Interindividual variation and dynamic response to diet. *Genome Research*. 2011. Vol. 21. № 10. P. 1616-1625.

146. Zhang T., Breitbart M., Lee W. H. et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology*. 2006. Vol. 4. № 1. P. 0108–0118.

147. Glass R. I., Parashar U. D., Estes M. K. Norovirus gastroenteritis. *The New England Journal of Medicine*. 2009. Vol. 361. № 18. P. 1726–1785.

148. Sheetal R. Modi, Henry H. Lee, Catherine S. Spina, James J. Collins. Antibiotic Treatment Expands the Resistance Reservoir and Ecological Network of the Phage Metagenome. *Nature*. 2013. Vol. 499 (7457). P. 219–222.

149. Matson D. O., Estes M. K., Tanaka T., Bartlett A. V. Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990. Vol. 9. P. 190–195.

150. Ninomiya M., Takahashi M., Nishizawa T. Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *Clin. Microbiol.* 2008. Vol. 46. P. 507-514.

151. Ott C., Duret L., Chemin I., Trepo C. Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J. Gen. Virol.* 2000. Vol. 81. P. 2949-2958.

152. Popgeorgiev N., Temmam S., R. Didier, D., Christelle Desnues. Describing the Silent Human Virome with an Emphasis on Giant Viruses. *Intervirology*. 2013. Vol. 56. P. 395-412.

153. Pride D. T., Salzman J., Haynes M., Rohwer F., DavissLong C. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME J.* 2012. Vol. 6. P. 915–926. doi 10.1038/ismej.2011.169. Epub 2011 Dec 8.

154. Breitbart M., Bonnain C., Malki K., Sawaya N. A. Phage puppet masters of the marine microbial realm. *Nature microbiology*. 2018. Vol. 3. P. 754–766. Doi 10.1038/s41564401880166y.

155. Tan S. K., Relman D. A., Pinsky B. A. (2017). The Human Virome: Implications for Clinical Practice in Transplantation Medicine. *J. Clin. Microbiol.* 2017. Vol. 55(10). P. 2884–2893. doi 10.1128/JCM.00489917.

156. Norman J. M., Handley S. A., Virgin H. W. Kingdomagnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology.* 2014. Vol. 146. P. 1459–1469.

157. Lee Y. K., Mazmanian S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science.* 2010. Vol. 330. № 6012. P. 1768-1773.

158. Uhr J. W. The antibody response to bacteriophage phi-X 174 in newborn premature infants / J. W. Uhr, J. Dancis, E. C. Franklin [et al] // *The Journal of clinical investigation.* 1962. Vol. 41. P. 1509-1513.

159. Foxman E. F. Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease / E. F. Foxman and A. Iwasaki // *Nature Reviews Microbiology.* 2011. Vol. 9. № 4. P. 254–264.

160. Brussow H. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion / H. Brussow, C. Canchaya and W.-D. Hardt // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2004. Vol. 68. № 3. P. 560–602.

161. Kim M, Lee H, Chang KO, Ko G. Molecular characterization of murine norovirus isolates from South Korea. *Virus Res.* 2009. № 147. P. 1–6. doi 10.1016/j.virusres.2009.08.013. Epub 2009 Sep 30.

162. Kernbauer E., Ding Y., Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature.* 2014. Vol. 516. P. 94–98.

163. Basic M., Keubler L. M., Buettner M., Achard M., Breves G. et al. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10 deficient mice. *Inflamm. Bowel Dis.* 2014. Vol. 20. P. 431–443. doi 10.1097/01.MIB.0000441346.86827.ed.

164. McFall-Ngai M. Adaptive immunity: Care for the community. *Nature.* 2007. Vol. 445. № 7124. P. 153.

165. Duerkop B. A., Hooper L. V. Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nature Immunology*. 2013. Vol. 14. № 7. P. 654–659.

166. Barton E. S. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection / E. S. Barton, D. W. White, J. S. Cathelyn et al. *Nature*. 2007. Vol. 447. № 7142. P. 326–329.

167. White D. W., Beard S., Barton E. S. Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunological Reviews*. 2012. Vol. 245. № 1. P. 189–208.

168. Hamzeh-Mivehroud M. Non-specific translocation of peptidisplaying bacteriophage particles across the gastrointestinal barrier / M. Hamzeh-Mivehroud, A. Mahmoudpour, H. Rezazadeh, and S. Dastmalchi. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008. Vol. 70. № 2. P. 577–581.

169. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota / M. Kane, L. K. Case, K. Kopaskie, A. Kozlova, C. MacDearmid et al. *Science*. 2011. Vol. 334. P. 245–249.

170. Horizontally acquired glycosyltransferase operons drive salmonellae lipopolysaccharide diversity / M. R. Davies, S. E. Broadbent, S. R. Harris, N. R. Thomson and M. W. van der Woude. *PLoS Genetics*. 2013. Vol. 9. № 6. Article ID e1003568.

171. М. К. Жевандрова В. И., Балаян М. С. Методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. Москва. 1964. 152с.

172. Minot S., Grunberg S., Wu G. D., Lewis J. D., Bushman F. D. Hypervariable loci in the human gut virome. *Current issue*. 2012. №109 (10). P. 3962–3966.

173. Barr J. J., Auro R., Furlan M., Whiteson K. L., Erb M. L. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110(26). P. 10771–10776.

174. 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.

175. Hsu B., Gibson T., Yeliseyev V., Liu Q., Lyon L. Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. *Cell Host & Microbe* 25. 2019. P. 803–814.

176. Duranti S., Lugli G. A, Mancabelli L., Armanini F., Turrone F. et al. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome*. 2017. Vol. 5(1). P. 66.

177. Боковой А. Г., Волкова Т. А., Гаспарян М. О. Смешанные ротавирусные и респираторные инфекции у детей. Сб. материалов Межрегиональной научно-практической конференции «Микст-инфекции у детей». Москва. 1995. часть II. С.11– 17.

178. Loosli C. Synergism between respiratory viruses and bacteria. *Yaie J. Biol. a. Med.* 1968. Vol. 40. P. 522– 540.

179. Аксенов О. А., Осипова З. А., Горячева Л. Г. Роль персистирующих ДНК-вирусов в патогенезе сочетанных вирусных инфекций. Сб. мат. межрегиональной научно-практической конференции «Микст-инфекции у детей» Москва. 1995. С. 34–40.

180. Шкробко В. А., Яковлев А. И., Белявский Е. Б. Микробно-вирусные ассоциации при острых кишечных расстройствах у детей. Полиомиелит и вирусные энцефалиты, вып.1. 1967. С. 171– 172.

181. Іванська Н. В., Рибалко С. Л. Роль молекулярної мімікрії у тестуванні ВІЛ-інфекції. Біополімери і клітина. 2005. Т. 21, № 2. С. 134-139.

182. Максименок О. В. Феномен антигенної мімікрії пептидів ВІЛ-1 та бактерій і маркери прогнозування перебігу у ВІЛ-інфекції : Автореф. Дис... канд. біол. наук: 03.00.06. АМН України; Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського. К., 2006. 29с.

183. Akour A. Probiotics and COVID-19: is there any link? *Lett Appl Microbiol.* 2020. Vol. 71 (3). P.229-234.

184. Зильбер Л. А. О симбиозе вирусов и микробов. *Усп. совр. биолог.* 1952. Вып. 33. С. 81-100.

185. Токарь Р. Г., Закстельська Л. Я., Шендорович С. Ф. Результаты совместного заражения тканевой культуры вирусом гриппа А2 и стафилококком. ЖМЭИ. 1971. № 6. С. 100-103.

186. Бахуташвили В. И. Иммунодепрессия и вирусные инфекции / В. И. Бахуташвили, Б. М. Корсантия, М. Г. Тохадзе. АН ГССР, Ин-т эксперим. морфологии им. А. Н. Натишвили. Тбилиси: Мецниереба. 1981. 114 с.

187. Гостева В. В. Взаємодія бактерій, вірусів і еукаріотичних клітин в умовах змішаної інфекції (електронно-мікроскопічне дослідження): автореф. на здобуття наук. ступ. канд. біол. наук: спец. 03.00.07 «мікробіологія». Москва. 1984. 30 с.

188. Sanford B. A. Bacterial Adherence to Virus-Infected Cells: A Cell Culture Model of Bacterial Superinfection / B. A. Sanford, A. Shelokov, M. A. Ramsey. *J. of Inf. Dis.* 1978. Vol. 137. P. 176–181.

189. Sanford B. A. Adherence of group B streptococci and human erythrocytes to influenza A virus-infected MDCK cells / B. A. Sanford, N. Smith, A. Shelokov, M. A. Ramsey // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1979. Vol. 160. P. 226-232.

190. Jane C. Deng Viral–bacterial interactions–therapeutic implications. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013. Vol. 7. P. 24-35.

191. Эссель А. Е., Пантелеева Л. Г., Мясненко А. М. Вирусно-бактериальные ассоциации. Изд-во Ростовск. универс. 1978. 224 с.

192. Паньков А. С. Модификация факторов патогенности в вирусно-бактериальной ассоциации. Materiály VIII mezinárodní vědecko – praktická conference «Dny vědy-2012». Díl 70. Lékařství. Ekologie: Praha. 2012. С.7-10.

193. Паньков А. С. Характеристика бактериальных ассоциаций при гриппе. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2010. № 2. С. 528

194. Hannah C. Moore. The interaction between respiratory viruses and pathogenic bacteria in the upper respiratory tract of asymptomatic Aboriginal and

non-Aboriginal children / Hannah C. Moore, Peter Jacoby, Amanda Taylor et al. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010. Vol. 29 (6). P. 540-5.

195. Быковский А. Ф., Миллер Г. Г. Ультраструктурная характеристика вируса бычьего лейкоза и его ассоциантов в культуре тканей. В сб.: Вирусы рака и лейкоза. М. 1979. С.115-117.

196. Миллер Г. Г., Раковська И. В. Электронно-микроскопическое изучение ассоциации микоплазмы и бычьего лейкозного вируса в культуре ткани. *Вопр. вирусол.* 1983. Вып. 5. С. 615–622.

197. Паньков А. С. Межбактериальные взаимодействия при гриппе. *Инфекционные болезни.* 2011. Том 9. № 1. С. 285.

198. Белобородова Н. В., Белобородов С. М. Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма. *Антибиотики и химиотер.* 2000. Вып. 2. С. 28–35.

199. Толоконская Н. П., Покровская И. В., Хохлова Н. И. Оценка микробиоценоза организма в клинической диагностике острых вирусных гепатитов. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2010. № 1 (141). С. 88–95.

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

201. Ентеровіруси: проблеми на шляху ерадикації поліомієліту/ В. П. Широбоков, В. І. Задорожня, О. І. Євтушенко, В. В. Бобир, Л. М. Гриценко // *Сучасні інфекції.* 2008. №3. С. 61-70.

202. Широбоков В. П., Бобир В. В. Ліофілізація ентеровірусів та їх бентонітових варіантів. *Журн. АМН України.* 2005. Т.11. №2. С. 377-381.

203. Tyler, K. L. Pathogenesis of viral infections. *Fundamental Virology.* 4 th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press. 2001. P. 199-243.

204. Uchiyama R. Antibiotic Treatment Suppresses Rotavirus infection and Enhances Specific Humoral Immunity / R. Uchiyama, B. Chassaing, B. Zhang, A. T. Gewitz // *The Journal of Infectious Diseases.* 2014. Vol. 210. P. 171–82.

205. Hayes, K. S. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris* / K. S. Hayes, A. J. Bancroft, M. Goldrick, C. Portsmouth, I. S. Roberts, R. K. Grencis. *Science*. 2010. Vol. 328. P. 1391–1394.

206. Michael, C. Purdy Viruses may play unexpected role in inflammatory bowel diseases. Washington University in St. Louis. Newsroom. January 22, 2014. Mode of access: <http://news.wustl.edu/news/Pages/27891.aspx>. Title from the screen.

207. Megan T. Baldrige. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection published / Megan T. Baldrige, Timothy J. Nice, Broc T. McCune, Christine C. Yokoyama et al. // *Science*. 2015 Vol. 347. P. 266–269.

208. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. Vol. 144. № 5. P. 646–674.

209. Grohmann G. Outbreak of human calicivirus gastroenteritis in a day-care center in Sydney, Australia / G. Grohmann, R. I. Glass, J. Gold, M. James et al. // *J. Clin. Microbiol.* 1991. Vol. 29. P. 544–550.

210. Jones M. K. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells / M. K. Jones, M. Watanabe, S. Zhu, C. L. Graves et al. // *Science*. 2014. Vol. 346. P. 755–759.

211. Osborne, L. C. Virus-helminth coinfection reveals a microbiota-independent mechanism of immunomodulation / L. C. Osborne, L. A. Monticelli, T. J. Nice, T. E. Sutherland et al. // *Science*. 2014. Vol. 345. P. 578–582.

212. Isaak D. D., Bartizal K. F., Caulfield M. J. Decreased pathogenicity of murine leukemia virus-Moloney in gnotobiotic mice. *Leukemia*. 1988. Vol. 2. P. 540-544.

213. Kouttab N. M., Jutila J. W. Friend leukemia virus infection in germfree mice following antigen stimulation . *J. Immunol.* 1972. Vol. 108. P. 591-595.

214. 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.

215. Ammann C. G. Lactate dehydrogenase-elevating virus induces systemic lymphocyte activation via TLR7-dependent IFN α responses by plasmacytoid dendritic cells / C. G. Ammann, R. J. Messer, K. E. Peterson, K. J. Hasenkrug // *PLoS One.* 2009. Vol. 4, Is. 7. 5 p.

216. Papaventsis D. Enteroviral Infection in Greek AIDS Patients / D. Papaventsis, P. Markoulatos, N. Mangafas et al. *Mol. Diagn.* 2004. Vol. 8 (1). P. 11–16.

217. Mary B. Liste. Enteric Virus Infections and Diarrhea in Healthy and Human Immunodeficiency Virus-Infected Children / Mary B. Liste, Ivelisse Natera, Jose A. Suarez et al. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000. Vol. 38 (8). P. 2873–2877.

218. Handley S. A. Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome / S. A. Handley, L. B. Thackray, G. Zhao et al. *Cell.* 2012. Vol. 151. № 2. P. 253-266.

219. Nwosu F. Gut Microbiota in HIV Infection: Implication for Disease Progression and Management / F.Nwosu, E.Avershina, R. Wilson, K. Rudi. Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice. 2014. Vol. 2014, Article ID 803185. P. 6.

220. Brenchley J. M. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection / J. M. Brenchley, D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri et al. *Nat Med.* 2006. Vol. 12. P. 1365–1371.

221. Majerle A. Interaction of the HIV-1 gp120 viral protein V3 loop with bacterial lipopolysaccharide: a pattern recognition inhibition / A. Majerle, P. Pristovsek, M. Mancek-Keber, R. Jerala. *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 26228-26237.

222. Li Q. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission / Q. Li, J. D. Estes, P. M. Schlievert, L. Duan, A. J. Brosnahan et al. *Nature*. 2009. Vol. 458. P. 1034–1038.

223. Ichinohe T. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses / T. Ichinohe, H. K. Lee, Y. Ogura, R. Flavell, A. Iwasaki. *J. Exp. Med.* 2009. Vol. 206. P. 79–87.

224. Oldstone M. B. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science*. 1988. Vol. 239. P. 500–502.

225. Roossinck M. J. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. Vol. 9. P. 99–108.

226. Xi Z. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection / Z. Xi, J. L. Ramirez, G. Dimopoulos. *PLoS Pathog.* 2008. Vol. 4, Is. 2. P. 12.

227. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Ширококов В. П. Кишковий віром та нормальна мікрофлора: особливості взаємодії. *Анали Інституту Мечнікова*. 2015. №2 . С. 25-29.

228. Незгода І. І., Науменко О. М. Дисбіоз кишківника у дітей: проблемні питання, сучасні методи діагностики. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*. 2011. № 5 (44). С. 29-33.

229. 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.

230. Боссарт В. Изучение влияния препарата из лактобактерий «Салко» на выживаемость и микрофлору кишківника у облучаемых животных. *Журн. микробиол.* 1990. 11. С. 6-9.

231. Коршунов В. М., Радакова Е. Д., Дугашева Л. Г. Влияние подкожной контаминации стафилококками на состояние микрофлоры кишківника у животных. *Журн. микробиол.* 1990. № 12. С.105.

232. Быков В. Л. Индукция кортикостероидами системного кандидоза у взрослых мышей, зараженных в неонатальном периоде. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1990. №5. С. 452-453.

233. Пат. 1363291 СРСР, МПК G09B23/28. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у крыс / Соболева С. В., Златник Е. Ю.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский институт эпидемиологии, микробиологии и гигиены. № 3940163/28-14; заявл. 30.12.87 опубл. 12.08.89, Бюл. № 48.

234. Вахрушкина А. Г. Патоморфологические изменения кишечника белых крыс и их коррекция бифидосодержащим средством Автореф. дис. на соиск. учен. степ. к.б.н. Улан-Уде. 2002. С. 24

235. Характеристика ультраструктурных изменений в слизистой оболочке тощей кишки после индуцированного ацетаминофеном дисбактериоза крыс / Р. И. Кравчук, В. М. Шейбак, А. И. Жмакин, М. В. Горецкий, А. С. Егоров. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2007. №1. С. 106-109.

236. Пинегин Б. В. и др. Дисбактериозы кишечника. М.: Медицина. 1984. С. 47-63.

237. Пат. 1697101 СРСР, МПК G09B23/28. Способ моделирования дисбактериоза кишечника / Коршунов В. М., Гигодман Г. А., Ручкин А. А., Гладко И. А.; заявитель и патентообладатель 2-й Московский государственный медицинский институт им. Н.И. Пирогова. – № 4721436/14; заявл. 20.07.89 опубл. 07.12.91. Бюл. № 45.

238. Ермоленко Е. И., Донец В. Н., Дмитриева Ю. В., Ильясов Ю. Ю. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками. Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 11. 2009. Вып. 1. С. 157-168.

239. Гороховський Є. Ю., Григорова Н. В., Сопрунова Т. А. Функціональний стан клітин Панета та морфометричні показники кишкового

епітелію в щурів при синдромі надлишкового бактеріального росту в тонкій кишці. Вісник запорізького національного університету. 2012. № 1. С. 91-98.

240. 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.

241. Морфологические изменения слизистой оболочки тонкой и толстой кишки при первичном дисбиозе и его коррекции пробиотиками / Т. И. Хомякова, Ю. Н. Хомяков, Ю. Е. Козловский, О. В. Макарова, А. Н. Овчарова, Л. П. Михайлова //Материалы международной научной конференции по пробиотикам и пребиотикам, Словакия. 2011. С. 43.

242. Пат. 2477894 Российская Федерация, МПК G09B23/28. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных / Дармов И. В., Чичерин И. Ю., Ердякова А. С., Погорельский И. П., Лундовских И. А.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «ВятГУ». – № 2011149501/14; заявл. 05.12.2011; опубл. 20.03.2013, Бюл. № 8.

243. Сучасні методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій: Методичні рекомендації / В. П. Широбоков, С. І. Доан, А. М. Щербинська, В. В. Бобир, Л. В. Долінчук, І. П. Олексієнко, В. А. Понятовський. Київ. 2012. С. 24.

244. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита. Глобальная программа по вакцинам и иммунизации ВОЗ. Женева. Москва. 1998. 114 с.

245. Широбоков В. П. Сравнительное изучение биологических свойств вирусов Коксаки и их селекционированных вариантов: Дис... д-ра мед. наук 03.00.06. К., 1977. 333 с.

246. Знаменський В. О., Дегтяр Н. В., Кузьминський С. Н. та інш. Микробиологическая диагностика дисбактериозов // Методичні рекомендації. Київ 1986. 28 с.

247. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes et particules de bacteriophage, Ann. Inst. Pasteur, t. 57, p. 652, 1936; Methods in medical research, ed. by J. H. Comroe, Chicago, 1953. V. 2, P. 7.

248. Вирусология. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Б. Мейхи. М. : Мир, 1988. С. 344.

249. Применение бентонита для выявления энтеровирусов у человека и во внешней среде: методические рекомендации. МЗ УССР. Киев, 1986 г. 23с.

250. Гринин А. С., Титов И. Н. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных. М. Колос. 1971. 238 с.

251. Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів: методичні вказівки. МОЗ України. Київ, 2007 р. 72 с.

252. Пат. 9903 Україна, МКИ G 01N33/569. Спосіб підвищення сорбційної здатності плівок-підкладок в електронній мікроскопії ентеровірусів: Пат. 9903 Україна, МКИ G 01N33/569. / Бобир В. В., Широбоков В. П., Войцеховський В. Г., Олексієнко І. П. (Україна); Національний медичний університет імені О. О. Богомольця. - №03751; Заявл. 20.04.05; Опубл. 17.10.2005. Бюл. №10.

253. Пиз Д. Гистологическая техника в электронной микроскопии. Москва. 1963. 164 с.

254. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. 1975. Москва: Мир. 328 с.

255. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting/ Michael J. Dykstra and Laura E. Reuss –2 nd.ed. 2003. P. 535.

256. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова. М.: Медицина. 1996. 544 с.

257. Вивчення спеціальної активності протимікробних лікарських засобів. Методичні рекомендації. Київ. 2004. 38с

258. Біостатистика / Москаленко В. Ф. та ін.; за заг. ред. В. Ф. Москаленка. К.: Книга плюс, 2009. 184 с.

259. Зайцев В. М., Лифляндский В. Г., Маринкин В. И. Прикладная медицинская статистика. СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. 432 с.
260. Антомонов М. Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. К., 2006. 558с.
261. Бобир В. В. Ентеровіруси при дисбіотичних порушеннях кишківника. Проблеми, досягнення и перспективи розвитку медико-біологічних наук и практичного здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета им. С. И. Георгиевского. 2009. Т. 145, часть V. С. 141.
262. Наказ МОЗ України від 18.05.2018 № 947 "Про внесення змін до Календаря профілактичних щеплень в Україні".
263. Stikas R. A. Anderson L. J., Parker R. A. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the Unites States. J. Infect. Dos. 1986. Vol. 153. P. 346-351.
264. Андриюшкова Н. Г. Значення ентеровірусів у серцево-судинній патології. Медична наука України. 2015. Т. 11. № 1-2 . С. 105-109.
265. Понятовский В. А., Широбоков В. П., Бобырь В. В. Сравнительная оценка методов детекции энтеровирусов из сточных вод. Материалы Международной научной конференции «Современная профилактическая медицина: от медицины патологий к медицине здоровья», Россия, г. Москва, 25-27 сентября 2013 г. С. 63–73.
266. Enriquez C., Abbaszadegan M., Peppe I, Richardson K., Margolin A. Comparison of Poliovirus Detection in Water by Cell Culture and Nucleic Acid Hybridization. Water Science & Technology. 1993. Vol. 27. No. 3-4. P. 315–319.
267. 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.
268. Задорожна В. І., Бондаренко В. І., Зубкова Н. Л. Вплив масового застосування живої поліомієлітної вакцини в Україні на забруднення довкілля ентеровірусами. Довкілля та здоров'я. 2002. №20. С. 27-28.

269. Бичурина М. А. Глобальная ситуация по полиомиелиту. Стратегия и тактика ВОЗ по ликвидации полиомиелита. Журнал инфектологии. 2011. Т. 3. № 2. С. 5-14.

270. Понятовський В. А., Бобир В. В., Ширококов В. П. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції для виявлення ентеровірусів. Профілактична медицина. 2012 р. № 3–4. С. 33–36.

271. Бобир В. В., Понятовський В. А. Ентеровіруси у хворих з ВІЛ/СНІД Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. №1 (04). 2011. Київ, 29-30 березня 2011р. С. 91-92.

272. 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.

273. 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. Ponyatovski. Preventive medicine. 2012. №1 (17). P. 22–25..

274. Cherkasova E. A. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine/ E.A. Cherkasova, M.L. Yakovenko, G.V. Rezapkin et al. J. Virology. 2005. Vol.79. P.1062–1070.

275. Изучение штаммов полиовирусом, выделенных у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями / Н. И. Романенкова, Н. Б. Розаева, М. А. Бичурина, И. Л. Коваль. Здоровье населения и среда обитания. 2004. № 10. С. 10-13.

276. Pavlov D. N., Zyl W. B., Heerden J., Kruger M., Blignaut L. Ehlers Prevalence of vaccine-derived polioviruses in stools of immunodeficient children in South Africa. Journal of Applied Microbiology. № 101 (2006) P.1367–1379.

277. Grabow W. O. K. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Water SA. 2001 Vol. 27. P. 251-268.

278. Понятовський В. А., Ширококов 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.

279. Woodward J., Gkrania-Klotsas E., Kumararatne D. Chronic norovirus infection and common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2017; Vol. 188(3). P. 363–370.

280. Brown L. K., Clark I., Brown J. R. et al. Norovirus infection in primary immune deficiency. *Rev Med Virol.* 2017. Review. PubMed PMID: 28271593.

281. Ahmed S. M., Hall A. J., Robinson A. E., et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect Dis.* 2014. Vol. 14(8). P. 725-730.

282. Nguyen G. T., Phan K., Teng I., Pu J., Watanabe T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. *Medicine (Baltimore).* 2017. Vol. 96(40). E 8139.

283. Хохлова Н. И., Капустин Д. В., Краснова Е. И., Извекова И. Я. Норовирусная инфекция (Обзор литературы). *Журнал инфектологии.* 2018; 10(1):5-14. Doi.10.22625/2072-6732-2018-10-1-5-14.

284. Скороход І. М. Модельне забезпечення соматичних та F-специфічних коліфагів при вірусологічному контролі технології водопідготовки : Автореф. дис... канд. біол. наук: 14.02.01. Ін-т гігієни та мед. екол. ім. О.М. Марзеєва АМН України. К. 2004. С. 21.

285. Schaper M., Jofre J., Uys M., Grabow W. O. K. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *Appl Microbiol.* 2002. Vol. 92. P. 657–667.

286. Cole D., Long S.C., Sobsey M. Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl. environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69. P. 6507–6514.

287. 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 2011р. Український науково-медичний журнал. Спеціальний випуск 2011. №3. С. 211-212.

288. Гриценко Л. М. Генотипові та фенотипові ознаки вірулентності вірусів ЕСНО. Автореферат дис... канд. мед. наук: 03.00.06. Нац. мед. Університеті мені О.О. Богомольця МОЗ України. К. 2010. 20 с.

289. 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.

290. Ворошилова М. К. Энтеровирусные инфекции человека. М. : Медицина. 1979. 330 с.

291. Агол В. И., Короткова Е. А. Липская Г. Ю. и др. Молекулярная эпидемиология и проблема ликвидации полиомиелита. Материалы 3-й международной конференции, посвященной 80-летию института имени Л. Пастера, СПб. 2003. С. 2.

292. Задорожна В. І., Фролов А. Ф., Зубкова Н. Л. Поліомієліт: імунопрофілактика та її вплив на еволюцію епідемічного процесу / За редакцією В. І. Задорожної. К.: ДІА, 2012. С. 238–271. ISBN 978-966-8311-83-3.

293. WHO: Advisory committee on poliomyelitis eradication: recommendations on the use of bivalent oral poliovirus vaccine types 1 and 3. Weekly epidemiological record. 2009. Vol. 84, № 29. P. 289–290.

294. Копаниця Л. В. Біологічні властивості поліовірусів, поширених на території України. Автореф. дис... канд. мед. наук: 03.00.06 Національний медичний ун-т імені О.О. Богомольця. К., 2003. 20 с.

295. Андрюшкова Н. Г. Значення ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу. Автореф. дис....канд.мед.наук. К. 2018. 20 с.

296. Понятовський В. А. Ентеровіруси в стічних водах Києва: видовий склад та біологічні властивості: Автореферат дис... канд. мед. наук: 03.00.06/ Нац. мед. Університеті мені О.О. Богомольця МОЗ України. К., 2015. 20 с.

297. Гирин В. Н. Энтеровирусы в сточных водах и научное обоснование способов деконтаминации: дис. ... доктора медицинских наук. К., 1982. С. 303.

298. 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.

299. 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.

300. Евтушенко А. И. Сравнительная чувствительность клеточных культур к энтеровирусам. Лабораторная диагностика. 2004. Вып. 4. С. 42- 46.

301. Гриценко Л. М. Порівняльна чутливість перещеплювальних клітинних культур до вірусів ЕСНО. Сучасні аспекти військової медицини. 2010. Вип. 16. С. 73-76.

302. Tasnee Chonmaitreel. Comparison of Cell Cultures for Rapid Isolation of Enteroviruses / Tasnee Chonmaitreel, Craig Ford, Candace Sanders, Helen L. Lucia. Journal of clinical microbiology. 1988. Vol. 26. No. 12. P. 2576-2580.

303. Nathalie J. Schmidt. Comparative Sensitivity of Various Cell Culture Systems for Isolation of Viruses from Wastewater and Fecal Samples / J. Nathalie,

Schmidt, H. Ho Helen, J. John Riggs, and Edwin H. Lennette. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978. Vol. 36. No. 3. P. 480-486.

304. Johnston S. L. G, Charles S. S. Presumptive Identification of Enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK Cell Lines. *Journal of clinical microbiology*. 1990. Vol. 28. No5. P. 1049-1050.

305. Порівняльна чутливість культур клітин до клінічних ізолятів ентеровірусів / В. В. Бобир, В. А. Понятовський, О. А. Назарчук, О. М. Дюжикова, В. П. Широбоков, Л. В. Долінчук. *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2016. №26. С. 88-91.

306. Широбоков В. П., Бобир В. В., Олексієнко І. П. Поверхневі компоненти вірусів Коксакі В та їх селекціонованих варіантів (За даними електронної мікроскопії). *Біомедична інженерія та медична фізика*. 2016. №1. С. 7-11.

307. Cynthia S. Goldsmith, Sara E. Miller Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 2009. P. 552-563.

308. Понятовський В. А., Бобир В. В. Оптимізація концентрації ентеровірусів із стічних вод для генетичного аналізу. *Український науково-медичний молодіжний журнал: тез. доп. V (66) Міжнародного науково-практичного конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини»*, жовтень 2012 р. Київ. 2012. № 3. С. 158.

309. Королев М. К. Электронная микроскопия как метод идентификации вирусом и диагностики вирусных инфекций. *Здравоохранение Белоруссии*, 1984. №5. С. 651-655.

310. Анцупова А. С. Электронно-микроскопическая диагностика вирусных заболеваний. *Вопросы вирусологии*, 1984, №3., Т. 29. С. 316-319.

311. 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.

312. Деркач Н. М. Пат. 103366 України, МПК А61К31/00, А61Р 1/00. № u2015 065234. Застосування декаметоксину як фармацевтично активної речовини для лікування шлунково-кишкових та кишкових інфекцій перорально: заявл. 02.07.2015; опубл. 10.12.2015; Бюл. 23.

313. Деркач Н. М. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування декаметоксину для лікування кишкових інфекцій: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.05. Нац. фармацевт. ун-т. Харків. 2018. С. 24.

314. Постанова Кабінету Міністрів України від 5 грудня 2018 р. № 1022 «Про затвердження Державної стратегії реалізації державної політики забезпечення населення лікарськими засобами на період до 2025 року».

315. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15 издание, переработанное и дополненное. М.: Новая волна. Издатель Умеренков, 2007. С. 953.

316. Палій Г. К. Антисептики в профілактиці і лікуванні інфекцій. 1997. К.: Здоров'я.

317. 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.

318. 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.

319. Nazarchuk O. A., Faustova M. O., Bobyr V. V., Kordon Yu. V. The investigation of the relationship between biofilm-forming properties of clinical strains of *P.aeruginosa* and their sensitivity to antiseptic medicines. Visnyk of Vinnytsya national medical university. 2019. № 22 (3). P. 403-406.

320. O'Hara A. M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 2006. Vol. 7. P. 688–93.

321. Pancov A. S. Characteristic of bacterial association during influenza. *Bulletin of the Russian State Medical University*. 2010. № 2. P. 528.

322. 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.

323. 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.

324. Бобир В. В. Особливості структурно-морфологічних змін при експериментальному антибіотикоіндукованому дисбіозі кишківника. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології», присвяченій 90-річчю акад. А. Я. Циганенка (24-26 червня 2019 року)*. Харків. 2019. С. 154.

325. Экспериментальная оценка эффективности препарата «Траметин» при экспериментальном сальмонеллезе у лабораторных и сельскохозяйственных животных/ В. А. Чхенкели, А. В. Анисимова, Е. Д. Романова, А. П. Калинович, М. В. Промтов. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2014. № 6 (100). С. 80-83.

326. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis /V. V. Bobyr, L. O. Stechenko, V. P. Shyrobokov, O. I. Kryvosheyeva, O. A. Nazarchuk, V. A. Poniatovskyi, S. M. Chuhrai. *Report of morphology*. 2019. №2, Vol.25. P. 78-84.

327. Євтушенко О. І. Ентеровіруси в патології плода та новонароджених: Дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06 / Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця. К., 2007. 302 с.

328. Методические указания. МУ 3.1.1.2363-08 Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусных (неполио) инфекций. Москва. Моркнига. 2020. С. 45. ISBN: 978-5-203080-36-3.

329. Терешин В. А., Круглова О. В. Оценка эффективности энтеросорбента Белый Уголь® у пациентов с заболеваниями гепатобилиарной системы. Вестник клуба панкреатологов. 2015. №3. С. 67-72.

330. Пономарьова О. В., Півнюк В. М., Носко В. М. Профілактика за допомогою вуглецевого ентеросорбенту гострої та відстроченої еметогенної токсичності хіміотерапевтичного лікування онкологічних хворих. Онкологія. 2008. Т. 10 № 3. С. 370-373.

331. Мельников О. Ф., Серезко Ю. О. Клініко-імунологічні дослідження впливу ентеросорбенту гідрогелю метилкремнієвої кислоти у хворих на рак верхніх дихальних шляхів під час хіміотерапії. Ринологія. 2009. №2. С. 32-37.

332. Мурзина Э. А. Обоснование применения энтеросорбентов в комплексной терапии хронических аллергодерматозов. Сучасні препарати та технології. 2013. № 2-3. С. 50-53.

333. Нагорная Н. В., Бордюгова Е. В., Дубовая А. В. Использование энтеросорбции в лечении атопического дерматита. Современная педиатрия. 2005. № 4 (9). С. 67-70.

334. Руденко А. В., Багдасарова И. В., Брудько А. П. Основание использования Энтеросгеля в комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний почек. Сучасні інфекції. 2003. №2. С. 120-122.

335. Прохорчик А. А. Сравнительная эффективность углеволокнистого и кремнийсодержащих энтеросорбентов при некоторых острых кишечных инфекциях: Автореф. дис. ...канд.мед.наук. СПб. 1995. С. 18.

336. Дюпук Ж. П., Жером М. С., Триа Ж. М. Терапевтическое применение медицинских глин в гастроэнтерологии. Русский медицинский журнал. 2006. №1. С. 35.

337. Пентюк А. А., Полеся Т. Л., Илика В. Г. Полисорб МП в профилактике и лечении желчнокаменной болезни и атеросклероза. *Врач.* 2008. № 2. С. 20–21.

338. Григорьев А. В. Адгезия патогенной микрофлоры на кремнийорганических сорбентах. Иммуно - биологические препараты нового поколения и методы их контроля. М. 1998. С. 114-120.

339. Григорьев А. В., Картель Н. Т. Адгезия патогенной микрофлоры на углеродных сорбентах. *ЖМЭИ.* 1991. №1. С. 11.

340. 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.

341. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Широбоков В. П., Назарчук О. А. Вплив сорбентів на тривалість виділення ентеровірусів від мишей з дисбіозом *Biomedical and Biosocial Anthropology.* 2017. №28. С. 39-42.

342. Широбоков 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

343. 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.

344. 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>

345. Acevedo A., Andino R. Library preparation for highly accurate population sequencing of RNA viruses. *Nature Protocols*. 2014. Vol. 9. № 7. P. 1760–1769.

346. Совершенствование молекулярно-эпидемиологического мониторинга полиовирусной инфекции в Республике Беларусь/ М. А. Ермолович, Е. О. Самойлович, И. Ф. Ухова, Е. Ю. Свирчевская, Г. В. Семейко. *Достижения медицинской науки Беларуси*. 2019.

347. Вирусы Коксаки В1–6 Как этиологический фактор энтеровирусной инфекции/ Н. И. Романенкова, М. А. Бичурина, Н. Р. Розаева, О. И. Канаева, Л. А. Шишко и др. *Журнал инфектологии*. Том 8, № 2, 2016. С. 65-71.

348. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Широбоков В. П. *Руководство по медицинской и санитарной микробиологии*. М., 2002, 2009.

349. Копаница Л. В., Широбоков В. П., Гордеева Л. К. Применение бентонитового теста для внутритиповой дифференциации поливирусов. *Лабораторная диагностика*. 2001. № 3. С. 31-36.

350. Демчишина І. В. Циркуляція вакциноспоріднених штамів в умовах ерадикації поліомієліту Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук 14.02.02 – епідеміологія 2008. 28с.

351. Фадеев Ф. А. Изменчивость рецепторной специфичности вируса ЕСНО 11 Автореф. 03.00.06, канд. биол. наук. Москва. 2008. С.21.

352. Костенко І. Г. Генетичні відмінності дисоціантів поліовірусів / Актуальні проблеми сучасної медицини : Збірка тез доповідей 58 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця з міжнародною участю, 28-31 жовтня 2003 р. К. : НМУ ім. О. О. Богомольця, 2003. С. 43.

353. Деркач Н. М., Штриголь С. Ю., Філімонова Н. І. Інноваційні перспективи перорального застосування лікарського препарату «Декасан» у вигляді 0,02 % розчину декаметоксину для лікування кишкових інфекцій: інформ. лист Укрмедпатентінформу МОЗ України № 359-2017. К., 2017. 4 с.

354. Блажеєвський М. Є., Карпушина С.А., Степаненко В. І., Баюрка С. І. Кількісне визначення декаметоксину у лікарських формах ензимно-кінетичним методом. Вісник фармації. 2007. № 4 (52). С. 13–15.

355. Derkach N. N., Shtrygol' S. Yu, Laryanovska Yu. B., Shapoval O. N. Decametoxin acute toxicity study and its medicinal form "Decasan" for the treatment of intestinal infections. Topical issues of new drugs development: Abstracts of International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Students. Kharkiv, April 23, 2015. Kh., 2015. P. 309–310.

356. Морфологическая характеристика иммунной системы мышей Balb/C при нарушении состава микрофлоры и коррекции его пробиотиками «Энтероцин» и «Колибактерин». А. Н. Овчарова, Л. П. Михайлова, С. Н. Серебряков, О. В. Макарова, Ю. Е. Козловский Ю. Е. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2009.

357. Щербакова Э. Г., Щербаков И. Т., Грачева Н. М. и др. Морфофункциональное состояние слизистой толстой кишки при действии иммунокорректоров и эубиотиков. Сб. науч. тр. «Успехи теоретической и клинической медицины». Москва, 1999. Вып. 3. С.40 -42.

358. Хорошилова Н. В. Иммунотерапевтические аспекты применения пробиотиков в клинической практике. Лечащий врач. 2003. №2. С.71-73.

359. Быков В. Л. Клетки Панета: история открытия, структурно-функциональные характеристики и роль в поддержании гомеостаза в тонкой кишке. Морфология: Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. СПб.: Эскулап. 2014. Т. 145. № 1. С. 67-80.

360. Демьяненко С. А. Состояние слизистой оболочки рта крыс при моделировании дисбиоза и гепатита. Вісник стоматології. № 3, 20. С. 10-13.

361. Romana Ponziani F., Bhoori S., Castelli C. et al. Hepatocellular Carcinoma is Associated with Gut Microbiota Profile and Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. doi: 10.1002/hep.30036.

362. Bajaj J., Liu E., Kheradman R., et al. Fungal dysbiosis in cirrhosis. Gut, published online June 3, 2017 ; doi:10.1136/gutjnl-2016-313170.

363. Петухов В. А., Стернина Л. А., Травкин А. Е. Нарушения функций печени и дисбиоз при липидном дистресс-синдроме Савельева: современный взгляд на проблему. *Consilium medicum* 2004. Т6. №6. С.406-411.

364. Campbell A., Loria R, Madge G. Influence of nutritional hypercholesterolemia on Coxsackievirus pathogenicity. *Abstr.79th Annu. Meet. Amer.Soc.Microbiol. Los Angeles, Calif., 1989. Washington. 258 p.*

365. Матюшенко К. В. Особенности изменений микробиоценоза кишечника при нарушении липидного обмена у летного состава Автореф. дис... канд. мед. наук: 14.00.05 Санкт-Петербург. 2005. С. 28.

366. Irtpatrick C., Bultmann B., Gruler H. Interaction, between enteroviruses and human endothelial cells in vitro. *Amer. J. Pathol.* 1985. Vol. 118, N 1. P. 15-25.

367. Ilbäck N. G., Mohammed A., Fohlman J., Friman G. Cardiovascular lipid accumulation with Coxsackie B virus infection in mice. *Am J Pathol.* 1990 Jan; № 136(1). P. 159–167. PMID: PMC1877460.

368. Campbell A. E., Loria R. M., Madge G. E., Kaplan A. M. Dietary hepatic cholesterol elevation: effects on coxsackievirus B infection and inflammation. *Infection and Immunity*, 01 Jul 1982. Vol. 37(1). P. 307-317 DOI: 10.1128/iai.37.1.307-317.1982.

369. Голубев Н. Н., Маев И. В., Самсонов А. А. Аспекты клинического применения энтеросорбента Неосмектин. *Болезни органов пищеварения.* 2008. № 2 (10). С. 62–65.

370. Николаев В. Г. и др. Энтеросорбция: состояние вопроса и перспективы на будущее. *Вестник проблем биологии и медицины.* 2007. № 4. С. 7–17.

371. Ширококов В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Создание оздоровительных средств нового поколения на основе смектита. *Врачебное дело.* 2015. № 1/2. С. 3-9.

372. Щербаков И. Т., Щербакова Э. Г., Трачева Н. М., Леонтьева Н. И., Растунова Г. А. Морфологическая характеристика слизистой оболоччи

толстой кишки у больных сальмонеллезом и пищевой токсикоинфекцией после комплексной терапии с применением пробиотиков. Биопрепараты. №2. 2009. С. 17-23.

373. Кротенко О. В. Зміни ліпідного метаболізму у хворих на нестабільну стенокардію на фоні коксаки в вірусній інфекції та їх терапевтична корекція: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : 14.01.11 "Кардіологія" . Інститут кардіології ім. М. Д. Стражеска. Київ. 2001. 20 с.

374. Широбоков В. П., Євтушенко О. І, Кротенко О. В. Патогенетичне обґрунтування застосування -3 ПНЖК для корекції порушень метаболізму ліпідів при коксаки В3 внутрішньоутробній інфекції: (Експериментальне дослідження). Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2005. N3. С. 5-11.

375. Benditt E., Baret T., McDougall Jk. Viruses in the etiology of atherosclerosis. Proc.Nat.Acad.Sci. 1983. Vol.80. P. 6383-6389.

376. Звенигородская Л. А., Черкашова Е. А., Самсонова Н. Г., Нилова Т. В., Сильверстова С. Ю. Целесообразность применения пробиотиков в лечении атерогенной дислипидемии. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2011. №2. С.37-43.

377. Понятовський В. А., Широбоков В. П., Бобир В. В. Порівняльна чутливість перещеплюваних культур клітин до ентеровірусів виділених із стічних вод. Український науково-медичний молодіжний журнал Спеціальний випуск №3. 2012. С. 11-14.

378. Nazarchuk O. A. Microbiological and molecular research of the resistance in gram-negative pathogens of infectious complications to carbapenem antibiotics, approaches to its combating, MJHS. 2017. Vol. 13(3). P. 22-32.

379. 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.

380. Rocafort M., Noguera-Julian M., Rive J. et al. Evolution of the gut microbiome following acute HIV-1 infection. *Microbiome*. 2019. №7(73). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0687-5>.

382. 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. – 158.

ДОДАТКИ

Додаток А



(11) 45163

(19) UA

(51) МПК (2009)
A61K 35/66
A61K 35/74 (2009.01)

- (21) Номер заявки: **u 2009 05618**
- (22) Дата подання заявки: **02.06.2009**
- (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **26.10.2009**
- (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **26.10.2009, Бюл. № 20**
- (72) Винахідники:
Широбоков Володимир Павлович, UA,
Бобир Віталій Васильович, UA,
Янковський Дмитро Станіславович, UA,
Димент Галина Семенівна, UA
- (73) Власник:
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д. ПРОЛІСОК",
с.В.Вільшанка, Васильківський р-н., Київська обл., 08671, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГЕЛЮ БЕНТОНІТУ ДЛЯ МЕДИЧНИХ ЦІЛЕЙ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей, що передбачає здрібнювання бентоніту, очищення від грубих часток і забруднюючих речовин та змішування з водою, який відрізняється тим, що бентоніт попередньо переводять у натрієву форму, а потім проводять операції, що чергуються, по суспендуванню й фракційному центрифугуванню суспензії бентоніту до одержання високоочищеної дрібнодисперсної фракції із вмістом сухих речовин 5-6 %.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
та післядипломної освіти
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця МОЗ України,

професор  О.М. Науменко
« 5 » _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
Результатів наукових досліджень

- Назва пропозиції:** «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
- Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
- Розробник:** Бобир Віталій Васильович.
- Джерело інформації:**
 - 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.
 - Пат.45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов В. П., Бобир В. В., Янковський Д. С., Гимент Г. С.; заявник і власник ТОВ «О.Д. Пролісок»; заявл 02.06. 2009; опубл. 26.10.2009, Бюл №20.
 - 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.
 - 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.
 - Bobyry V. V., Poniatovskiy V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 - Bobyry V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskiy V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
 - 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.
- Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (протокол засідання № 1 від 27 серпня 2020 р.).
- Ефективність впровадження:** покращено якість знань про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування; біологічні властивості збудників ентеровірусних інфекцій; особливості ультраструктурних патоморфологічних змін кишки при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів, антисептиків.

Відповідальний за впровадження: к.мед.н., доцент

 В.В. Мельник

Голова комісії,
завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
Національного медичного
університету імені О.О. Богомольця МОЗ України,
академік НАН та НАМН України,
д.мед.н., професор

 В.П. Широков



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Ужгородського національного

університету

професор

І.П. Студеняк

2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. Розробник: Бобир Віталій Васильович.
4. Джерело інформації:
 1. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskyi V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
 2. Бобир В.В. Понятовський В.А., Дюжикова О.М., Широбоков В.П. Нові дані про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування. *Вісник морфології*. 2015. №2. Т. 21. С. 531-537.
 3. 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.
 4. Бобир В.В., Понятовський В.А., Дюжикова О.М., Широбоков В.П., Назарчук О.А. Вплив сорбентів на тривалість виділення ентеровірусів від мишей з дисбіозом. *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2017. №28. С. 39-42.
 5. Bobyr V. V., Poniatovskyi V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 6. 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.
5. Де впроваджено. Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології, епідеміології з курсом

інфекційних хвороб медичного факультету Ужгородського національного університету (протокол засідання № 1 від 30 серпня 2020 р.).

- 6. Ефективність впровадження:** введено в початковий процес особливості ультраструктурних патоморфологічних змін кишки при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів та пробіотиків.

Відповідальний за впровадження: к.м.н., доцент *Когутич* А.І. Когутич

Голова комісії
завідувач кафедри мікробіології,
вірусології, епідеміології з курсом інфекційних хвороб
медичного факультету УжНУ
д.мед.н., професор *Коваль* Г. М. Коваль





ПРЕЗИДИУМ «АКТВЕРДЖУЮ»
 Проєкт науково-педагогічної роботи
 ВДНЗ України «Буковинський державний
 медичний університет»

І. В. Геруш
 14 жовтня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ Результатів наукових досліджень

1. **Назва пропозиції:** «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. **Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. **Розробник:** Бобир Віталій Васильович.
4. **Джерело інформації:**
 1. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskiy V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
 2. Бобир В.В., Понятовський В.А., Дюжикова О.М., Ширококов В.П. Нові дані про людський вірус та вплив мікробіоти на його функціонування. *Вісник морфології*. 2015. №2. Т. 21. С. 531-537.
 3. Пат.45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов 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.
 4. 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.
 5. Bobyr V. V., Poniatovskiy V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 6. 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.
5. **Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології та вірусології ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» (протокол засідання № 1 від 25 серпня 2020 р.).
6. **Ефективність впровадження:** введено в навчальний процес особливості ультраструктурних змін при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів та пробіотиків.

Відповідальний за впровадження: к.біол.н., доцент



А. О. Міхсєв

Голова комісії

Завідувач кафедри мікробіології та вірусології
 ВДНЗ України «Буковинський державний
 медичний університет»,
 доктор медичних наук, професор

С. С. Дейнека

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з наукової роботи

 ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
 професор  О.О. Гудар'ян
 « 7 » вересня 2020р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
Результатів наукових досліджень

1. **Назва пропозиції:** «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. **Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. **Розробник:** Бобир Віталій Васильович.
4. **Джерело інформації:**
 1. 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.
 2. Пат.45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов В. П., Бобир В. В., Янковський Д. С., Гимент Г. С.; заявник і власник ТОВ «О.Д. Пролісок»; заявл 02.06. 2009; опубл. 26.10.2009, Бюл №20.
 3. Бобир В. В., Понятовський В. А., Настенко В. Б. Порівняльне дослідження динаміки збереження інфекційності лабораторних штампів та клінічних ізолятів вірусів Коксакі В. *Вісник морфології*. 2016. №2 (Т. 22). С. 240-242.
 4. 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.
 5. Bobyr V. V., Poniatovskyi V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 6. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskyi V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
 7. 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.
5. **Де впроваджено.** Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».
6. **Ефективність впровадження:** покращено якість знань про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування; біологічні властивості збудників ентеровірусних інфекцій; особливості ультраструктурних патоморфологічних змін кишки при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів, антисептиків.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Голова комісії:

Члени комісії:



проф. Степанський Д.О.

проф. Кременчуцький Г.М.

доц. Шарун А.В.

протокол № 2 від 04.09. 2020 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
перший проректор
Івано-Франківський національний
медичний університет МОЗ України

професор  Г. М. Ерстенюк
« 4 » вересня 2020 р.




АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. Розробник: Бобир Віталій Васильович.
4. Джерело інформації:
 1. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskiy V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
 2. 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.
 3. Пат.45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов В. П., Бобир В. В., Янковський Д. С., Гимент Г. С.; заявник і власник ТОВ «О.Д. Пролісок»; заявл 02.06. 2009; опубл. 26.10.2009, Бюл №20.
 4. 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.
 5. Bobyr V. V., Poniatovskiy V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 6. 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.
5. Де впроваджено. Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Івано-Франківського національного медичного університету МОЗ України (протокол засідання № 7 від 12 вересня 2020 р.).
6. Ефективність впровадження: введено в початковий процес термін «віром» та вплив мікробіоти на його функціонування; біологічні властивості збудників ентеровірусних інфекцій; особливості ультраструктурних патоморфологічних змін кишки при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів та пробіотиків.

Відповідальний за впровадження: к.мед.н., доцент

 Куровець Л. М.

Голова комісії
завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
Івано-Франківського національного медичного
університету,
д.мед.н., професор

 Р. В. Куцик



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. Розробник: Бобир Віталій Васильович.
4. Джерело інформації:
 1. 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.
 2. Ширококов В. П., Бобир В. В., Олексієнко І. П. Поверхневі компоненти вірусів Коксакі В та їх селекціонованих варіантів. *Біомедична інженерія та медична фізика*. 2016. №1. С. 7-11.
 3. Пат.45163 Україна. МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов В. П., Бобир В. В., Янковський Д. С., Гимент Г. С.; заявник і власник ТОВ «О.Д. Пролісок»; заявл 02.06. 2009; опубл. 26.10.2009, Бюл №20.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. Bobyr V. V., Poniatovskiy V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 8. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskiy V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
5. Де впроваджено. Впроваджено в навчальний процес на лекціях, практичних заняттях на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України (протокол засідання № 10 від 20 лютого 2020 р.).
6. Ефективність впровадження: покращено якість знань про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування; біологічні властивості збудників ентеровірусних інфекцій; особливості ультраструктурних патоморфологічних змін кишки при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів, антисептиків.

Відповідальний за впровадження: к.мед.н., доцент  І. М. Вовк

Голова комісії
завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
Вінницького національного медичного
університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України,
д.мед.н., професор


В. П. Ковальчук

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
мед. професор М'якоєдов В. В.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції:** «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. **Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34. Бобир Віталій Васильович.
3. **Джерело інформації:**
 1. 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.
 2. Пат.45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов В. П., Бобир В. В., Янковський Д. С., Гимент Г. С.; заявник і власник ТОВ «О.Д. Пролісок»; заявл 02.06. 2009; опубл. 26.10.2009, Бюл №20.
 3. 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.
 4. 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.
 5. Bobyr V. V., Poniatovskiy V. A., Chobotar A. P., Stechenko L. O., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Kovalenko O. O. Features of structural-morphological changes in cases of experimental intestinal antibiotic-induced dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2018. Vol.24. №3. P. 26-31.
 6. Bobyr V. V., Stechenko L. O., Shyrobokov V. P., Kryvosheyeva O. I., Nazarchuk O. A., Poniatovskiy V. A., Chuhrai S.M. Modeling of viral-bacterial infections against antibiotic-induced intestinal dysbiosis. *Reports of Morphology*. 2019. Vol. 25. № 2. P. 78-84.
 7. 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.
4. **Де і коли впроваджено.** в навчальний та науковий процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету МОЗ України.
5. **Результат та ефективність впровадження:** покращено якість знань про людський віром та вплив мікробіоти на його функціонування; біологічні властивості збудників ентеровірусних інфекцій; особливості ультраструктурних патоморфологічних змін кишки при вірусно-бактеріальній інфекції; сучасні способи моделювання дисбіотичних порушень та нові можливості їх ефективної корекції за допомогою сучасних сорбентів, антисептиків.
6. **Термін впровадження:** 2020-2021 навч. рік.
7. **Зауваження та пропозиції:** не має.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова ХНМУ (протокол № 13 від 16.09.2020).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри мікробіології, вірусології
та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова ХНМУ,
д. мед. н., професор

М. М. Мішина

„ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор ДУ Інституту
епідеміології і інфекційних
хвороб імені

Л.В.Громашевського

Д.М.Н., професор

Марішевський В.Ф.



АКТ

Впровадження результатів НДР на тему: „Вивчення особливостей ентеровірусів у хворих з ВІЛ-інфекцією”

Дослідження, проведені на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця довели, що кількісні і якісні показники обсіменіння ентеровірусами ВІЛ-інфікованих і хворих на ВІЛ/СНІД не відрізняються від контрольної групи здорових осіб.

Це дає можливість сформулювати такі практично значущі висновки і рекомендації, які можуть бути впроваджені у роботу лікувальних підрозділів та наукових лабораторій інституту:

1. ВІЛ-інфіковані особи не являються загрозливим джерелом збудників ентеровірусних інфекцій.
2. В організмі ВІЛ-інфікованих і хворих на ВІЛ/СНІД не селекціонуються штами ентеровірусів з підвищеною вірулентністю, у тому числі вакцинного походження.
3. Під час перебування в організованих колективах (дитячі садочки, школи та ін.) ВІЛ-інфіковані не представляють загрозу відносно ентеровірусів для інших осіб.

Ці результати мають важливе практичне значення. Прошу врахувати дані положення у подальшій лікувально-профілактичній та науковій роботі закладу.

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Заступник директора з науково-педагогічної роботи ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Компанець Т.А.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва роботи:** Методичні рекомендації «Сучасні методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій».
2. **Автори:** акад. НАН та НАМН України, проф., д.мед.н. Ширококов В.П., доц. к.мед.н. Бобир В.В., проф., д.мед.н. Доан С.І., проф. д.мед.н. Щербинська А.М., к.б.н. Олексієнко І.П., Долінчук Л.В., Понятовський В.А.
3. **Пропозиція для впровадження:** Виділення ентеровірусів в культурах клітин, серологічна, молекурно-генетична ідентифікація та просвічуюча електронна мікроскопія у сучасній лабораторній діагностиці ентеровірусних інфекцій.
4. **Актуальність дослідження:** Ентеровіруси відіграють важливу роль в інфекційній патології людини, викликаючи захворювання з різними клінічними проявами. В більшості випадків (близько 85%) ентеровірусна інфекція протікає безсимптомно. В 12-14% клінічних випадків спостерігається лихоманка легкого або середнього ступеня тяжкості і тільки в 1-3% випадків ЕВ викликають тяжкий перебіг захворювання. В зв'язку з недостатньою етіологічною діагностикою реальне значення ентеровірусної інфекції залишається невідомим.
5. **Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України (кафедра мікробіології, вірусології та імунології).
6. **Установа-співрозробник:** Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України.
7. **Джерела інформації:** Сучасні методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій: метод. рекомендації / Ширококов В.П., Бобир В.В., Доан С.І., Щербинська А.М., Олексієнко І.П., Долінчук Л.В., Понятовський В.А., НМУ ім.О.О. Богомольця, Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України.-Київ, 2012. -24 с.
8. **Базова установа, що проводить впровадження:** кафедра вірусології ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка
9. **Термін впровадження:** 01.09.2014 – 27.06.2015 рр.
10. **Форма впровадження:** результати досліджень впроваджено у навчальний процес під час викладання курсу “Сучасні методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій” для студентів.
11. **Кількість студентів, що прослухали курс:** 20.
12. **Соціально-економічний ефект:** покращання підготовки студентів з актуальних питань сучасної лабораторної діагностики.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри вірусології, д.б.н., професор

В.П. Поліщук

02.09.2014р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Генеральний директор
 (головний лікар) КНП
 «Тернопільська університетська
 лікарня» ТОВ
 Бліхар Василь Євгенович
 «2» 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Ентеровіруси в структурі дисбіотичних розладів».
2. Установа-розробник: Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології; 03680, м. Київ, просп. Перемоги, 34.
3. Розробник: Бобир Віталій Васильович.
4. Джерело інформації:
 1. Пат. 45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей / Ширококов 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.
 2. 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
 3. 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.
 4. 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>
 5. 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. – 158.
 6. 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. .
5. Де впроваджено. Впроваджено в роботу бактеріологічний підрозділ у складі клініко-діагностичній лабораторії
6. Ефективність впровадження: у відповідності до запропонованої автором стратегії, направленої на використання сорбентів та пробіотиків, покращено якість мікробіологічної діагностики дисбіотичних порушень та вдосконалено способи корекції дисбіозу.

Відповідальний за впровадження: Красій Наталія Іванівна

Завідувач клініко-діагностичної лабораторії Степанчук Наталія Семенівна



О.Д.ПРОЛІСОК

**Товариство з обмеженою відповідальністю
фірма «О.Д. Пролісок»**

Україна, 08671, Київська обл., Васильківський р-н, с. В. Вільшанка
Тел./факс: (04571) 4-42-17, (044) 331-49-63

Р/р № 26004000876001, ПуАТ «КБ «Акордбанк» в м.Київ,
МФО 380634, код ЄДРПОУ 19405739

E-mail: prolysook_kiev@ua.fm

<http://www.symbiter.ua>

№ 4
«02» листо 2019р.

Науково-виробнича компанія «О.Д. Пролісок» (адреса 08671, Київська обл., Васильківський р-н, с. Велика Вільшанка, вул. Софіївська, 17а) засвідчує, що доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця Бобир Віталій Васильович є співавтором розробки методики отримання гелю бентоніту для медичних цілей (патент 45163 Україна, МПК А61К35/66, А61К 35/74 «Спосіб одержання гелю бентоніту для медичних цілей»). Названі матеріали використані для промислового виробництва препарату «Симбіогель[®]» (попередня назва «Смектовіт[®]»).

Генеральний директор
НВК «О.Д. Пролісок»



Д.С. Янковський
Д.С. Янковський

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**(* – особистий внесок здобувача)**

1. Бобир В. В., Понятовський В. А., Дюжикова О. М., Широбоков В. П. Кишковий віром та нормальна мікрофлора: особливості взаємодії. Аналіз 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 Коксаки 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., Широбоков 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., Широбоков 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. Широбоков, 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. Ponyatovski. *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 перещеплюваних 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., Широбоков 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. Широбоков 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., Широбоков 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., Shyrobokov 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. (* – 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. Палий, О. А. Назарчук, Бобир В. В., О. О. Гончар, Т. Л. Гридина, Д. В. Палий, 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 колифагів 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).

ДОДАТОК Г

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Бобир В. В. Ентеровіруси при дисбіотичних порушеннях кишківника. 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.

2. 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).

3. 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).

4. 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).

5. 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).

6. 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.

7. 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).

8. Сравнительная оценка методов детекции энтеровирусов из сточных вод / В. А. Понятовский, В. П. Ширококов, 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.

9. 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.

10. 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.