

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 579:57.084.1

МОДЕЛЮВАННЯ ЕНТЕРОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ
У МИШЕЙ З ДИСБІОЗОМ КИШЕЧНИКА

Понятовський Вадим Анатолійович,
vadpon@yandex.ru

Понятовський В.А., Бобир В.В., Настенко В.Б.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Резюме. Дану експериментальну роботу присвячено моделюванню ентеровірусних інфекцій у тварин з кишковими дисбіотичними порушеннями. В якості ентеровірусу було обрано вакцинний штам вірусу поліомієліту 2 серотипу. Експериментальною моделлю слугували білі миші 30-денного віку лінії Balb/c. Дисбіоз формували шляхом перорального введення тваринам комбінації антибактеріальних препаратів ампіциліну та метронідазолу у дозах по 5, 10 та 20 мг/тварину на день. Результати досліджень показали, що після перорального введення комплексу ампіциліну та метронідазолу у лабораторних тварин формується виражений дисбіоз. Визначено оптимальну дозу для моделювання дисбіозу даними препаратами: по 10 мг/тварину. Встановлено, що збільшення дози антибактеріальних препаратів не впливає на глибину дисбіотичних проявів у кишечнику мишей, а проявляється лише зменшенням ваги тіла тварин. Крім того, експериментально доведено, що розвиток дисбіозу у мишей, сприяє більш інтенсивному звільненню тонкої та товстої кишок від ентеровірусів. У тварин з дисбіозом виділення вірусів тривало близько 5-6 діб, в той час, як у контрольних тварин вірус виділявся до 10 діб. Зроблено припущення, що бактерії можуть "маскувати" віруси від факторів імунного захисту, а зниження кількості кишкових бактерій після проведеної антибіотикотерапії прискорює звільнення організму від вірусних агентів. Не виключено, що віруси здатні встановлювати "симбіотичні" відносини з бактеріями і завдяки цьому довше знаходиться в кишечнику тварин. Хоча, очевидно, існують й інші фактори, які впливають на швидкість їх виведення з організму.

Ключові слова: дисбіоз, нормальна мікрофлора, антибіотики, ентеровіруси.

Вступ. Однією з особливостей розвитку сучасної мікробіології є актуалізація вчення про нормальну мікрофлору людини. Проте, невідомим залишається роль у формуванні дисбіотичних процесів вірусів, зокрема ентеровірусів, активність яких почала зростати після припинення циркуляції "диких" поліовірусів у європейському регіоні.

Мега роботи. Дослідити можливість моделювання ентеровірусних інфекцій у тварин з дисбіотичними порушеннями в кишечнику та з'ясувати вплив таких порушень на тривалість виділення вірусу.

Матеріали та методи. В якості кишкового ентеровірусу використано вакцинний штам вірусу поліомієліту 2 серотипу. Експериментальною моделлю обрано 30-денних білих мишей лінії Balb/c, що пройшли попередню акліма-

тизацію в умовах лабораторії. Дисбіоз моделювали шляхом введення тваринам комбінації ампіциліну та метронідазолу у дозах від 5 до 20 мг/тварину в день кожного з препаратів [1]. Усі тварини до початку дослідження були розділені на 5 груп (три дослідні та дві контрольні) по 20 тварин в кожній. Кожна з трьох дослідних груп протягом 5 діб перорально отримувала антибактеріальні препарати (1 група – 20 мг/тварину, 2 група – 10 мг/тварину, 3 група – 5 мг/тварину), при цьому добова доза кожного з препаратів перевищувала терапевтичну у 5-10 разів. Щодня, починаючи з другої доби, в квютах з тваринами міняли підстилку для полегшення відбору свіжих фекальних мас. Відбір матеріалу та введення тваринам розчинів антибіотиків повторювали протягом 5 діб, після чого бактеріологічними методами визначали загальну кількість фекаль-

ної мікрофлори та окремих її представників (ешерихій, біфідобактерій, лактобактерій) [2]. Зразки фекальних мас для виділення вірусів відбирали на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17 та 21 добу. Титрування ентеровірусів здійснювали мікрометодом за загальноприйнятою методикою, з використанням культур клітин HEp-2 [3]. Контрольні групи формувалися за наступним принципом: контрольна група №1 – тварини, яким перорально було інкульовано вірус ВПМ2 типу об'ємом 100 мкл у концентрації 10^{-7} ; контрольна група №2 – тварини, які не отримували ні антибактеріальні препарати, ні ентеровіруси.

Результати та обговорення. Експерименти показали, що після використання комплексу ампіциліну та метронідазолу у всіх піддослідних тварин формувалася виражений дисбіоз (табл. 1). Разом з тим встановлено, що

збільшення дози антибіотиків суттєво не впливає на глибину дисбіозу в кишечнику мишей (таблиця 1). Одночасно зафіксовано інтенсивне зниження ваги тіла тварин при зростанні дози антибактеріальних препаратів. Так, вага мишей, які отримували препарати в дозі по 5 мг/тварину на 5, 10 та 15 добу знизилася на 2,0, 2,8 та 2,04 грам відповідно, в той час як вага тварин, які отримували препарати в дозі по 20 мг/тварину зменшилася на 4,75, 5,86 та 5,81 грам відповідно, у порівнянні з контролем №2 (рис. 1). Невиключено, що зростання дози антибактеріального препарату призводить до реалізації його побічних властивостей, що супроводжуються зниженням ваги тіла тварин.

Експерименти дозволили зафіксувати більш інтенсивне звільнення організму лабораторних тварин від ентеровірусів на фоні формування дисбіотичних порушень.

Таблиця 1.

Результати бактеріологічного дослідження фекалій мишей після пероральної інюкуляції комбінації ампіциліну та метронідазолу

День	Показники	Групи			
		I	II	III	K2
2	Загальне мікробне число	$1,1 \pm 0,6 \times 10^{-9}$	$7,0 \pm 0,6 \times 10^{-8}$	$5,8 \pm 0,4 \times 10^{-9}$	$7,8 \pm 0,4 \times 10^{-9}$
	Кишкова паличка	$1,8 \pm 0,6 \times 10^{-0}$	$1,4 \pm 0,4 \times 10^{-0}$	$1,2 \pm 0,6 \times 10^{-0}$	$1,8 \pm 0,4 \times 10^{-0}$
	Біфідобактерії	$2,6 \pm 0,4 \times 10^{-0}$	$1,2 \pm 0,6 \times 10^{-7}$	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{-0}$	$3,1 \pm 0,4 \times 10^{-7}$
	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	$1,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \pm 0,6 \times 10^{-3}$	$1,4 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$2,2 \pm 0,5 \times 10^{-3}$
	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	$1,6 \pm 0,4 \times 10^{-0}$	$3,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$	$1,2 \pm 0,6 \times 10^{-0}$	$1,4 \pm 0,4 \times 10^{-8}$
4	Загальне мікробне число	$1,6 \pm 0,4 \times 10^{-0}$	$1,8 \pm 0,6 \times 10^{-0}$	$1,6 \pm 0,7 \times 10^{-0}$	$8,2 \pm 0,5 \times 10^{-8}$
	Кишкова паличка	$4,2 \pm 0,6 \times 10^{-3}$	$2,4 \pm 0,6 \times 10^{-4}$	$3,8 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	$2,4 \pm 0,6 \times 10^{-0}$
	Біфідобактерії	$1,8 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \pm 0,7 \times 10^{-3}$	$1,8 \pm 0,7 \times 10^{-3}$	$2,8 \pm 0,4 \times 10^{-0}$
	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	$8,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$9,4 \pm 0,7 \times 10^{-5}$	$1,1 \pm 0,6 \times 10^{-9}$	$1,1 \pm 0,6 \times 10^{-9}$
	Кишкова паличка	$3,8 \pm 0,6 \times 10^{-1}$	$1,4 \pm 0,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \pm 0,4 \times 10^{-1}$	$1,6 \pm 0,4 \times 10^{-0}$
	Біфідобактерії	$2,4 \pm 0,4 \times 10^{-2}$	$1,6 \pm 0,6 \times 10^{-2}$	$1,2 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$1,8 \pm 0,6 \times 10^{-0}$
	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; K2 – тварини, які не отримували антибактеріальні препарати.

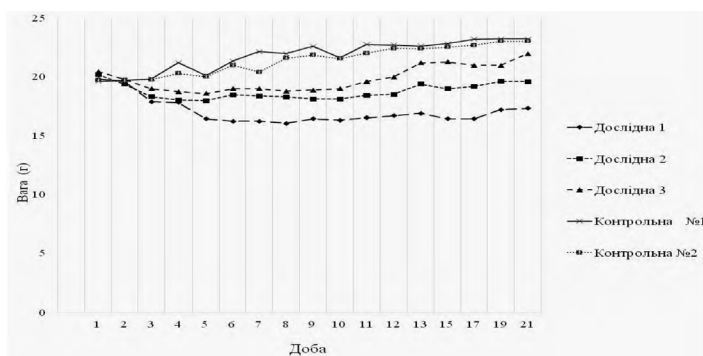


Рисунок 1. Динаміка зміни ваги тварин в процесі моделювання дисбіотичних станів.

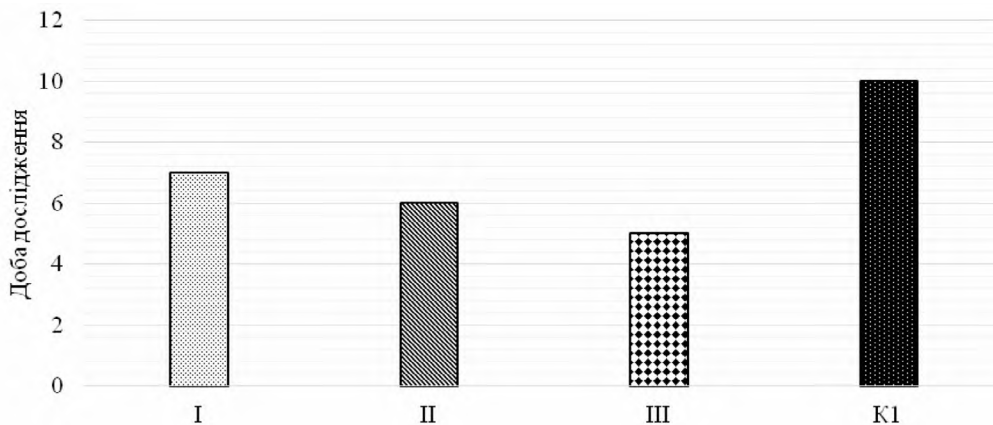


Рисунок 2. Тривалість виділення вірусу поліомієліту у мишей з дисбіозом.

Примітки: I – тварини, які отримували антибіотики в концентрації 20 по мг/тварину в день; II – тварини, які отримували антибіотики в концентрації 10 по мг/тварину в день; III – тварини, які отримували антибіотики в концентрації 5 по мг/тварину в день;

K1 – тварини, які не отримували антибіотики з метою формування дисбіозу.

Термін виведення ентеровірусів у тварин з дисбіозом складав 5 днів, а у контрольних тварин він становив 10 днів. Крім того, встановлено залежність тривалості виділення ентеровірусів від дози використаних антибіотиків: з фекальних мас тварин, які отримували антибіотики в дозах 10-20 мг/тварину в день вірус поліомієліту здатен виділятися протягом 5 днів, при зниженні дози препарату до 5 мг/тварину в день, тривалість виділення ентеровірусів подовжувалася на 1 добу.

Висновки. Результати досліджень показали ефективність моделювання дисбіотичних порушень у лабораторних тварин шляхом перорального введення комплексу ампіциліну та метронідазолу. Експериментально обґрунтовано оптимальну дозу для моделювання дисбіозу: 10 мг/тварину в день. Встановлено, що зростання дози антибіотиків у два-чотири рази несуттєво позначається на бактеріологічних показниках, а супроводжується лише вираженою втратою маси тіла тварин. Крім того, показано, що розвиток дисбіозу у мишей, сприяє більш швидкому звільненню тонкої та товстої кишок від вірусу поліомієліту 2 типу. У таких тварин виділення вірусів тривало близько 5-6 днів, в той час, як у контрольних особин вірус виділявся до 10 днів. Зроблено припущення, що представники нормаль-

ної мікрофлори можуть активно “маскувати” вірусні агенти, а використання антибактеріальних препаратів робить віруси більш доступними для факторів імунного захисту організму.

Конфлікт інтересів.

Автор заявляє, що не має конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерела фінансування.

Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Sharon K. Kuss. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis / Sharon K. Kuss, Gavin T. Best, Chris A. Etheredge, Andrea J. Pruijssers, Johanna M. Frierson, Lora V. Hooper, Terence S. Dermody, Julie K. Pfeiffer // Science. – 2011. – Vol. 334. – № 6053 – P. 249-252.
2. Бактериологическая диагностика дисбактериоза: Метод. рекомендації для врачей-курсантов. – Казань, 1989. – 30 с.
3. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомеелита. ВООЗ, Женева. – 2005. – С.112.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭНТЕРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У МЫШЕЙ С ДИСБИОЗОМ КИШЕЧНИКА

Понятовский В.А., Бобыр В.В., Настенко В.Б.
Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Резюме. Экспериментальная работа посвящена моделированию энтеровирусных инфекций у животных с дисбиотическими нарушениями в кишечнике. В качестве энтеровируса избран вакцинный штамм вируса полиомиелита 2 серотипа. Экспериментальной моделью служили белые мыши 30-дневного возраста линии Balb/c, прошедшие акклиматизацию. Дисбиоз формировали путем перорального введения животным комбинации антибактериальных препаратов ампициллина и метронидазола в дозах по 5, 10 и 20 мг / животное в день.

Результаты исследований показали, что после приема внутрь комплекса ампициллина и метронидазола у лабораторных животных формируется выраженный дисбиоз. Определена оптимальную дозу для моделирования дисбиоза данными препаратами: по 10 мг/животное в день. Установлено, что увеличение дозы антибактериальных препаратов не влияет на глубину дисбиотических проявлений в кишечнике мышей, а проявляется только уменьшением веса тела животных.

Кроме того, экспериментально доказано, что развитие дисбиоза у мышей, способствует более интенсивному освобождению кишечника от энтеровирусов. У животных с дисбиозом выделение вирусов длилось около 5-6 суток, в то время, как в контрольных животных вирус выделялся до 10 суток. Сделано предположение, что бактерии могут "маскировать" вирусы от факторов иммунной защиты, а снижение количества бактерий в кишечнике после проведенной антибиотикотерапии ускоряет освобождение организма от вирусных агентов. Не исключено, что вирусы способны устанавливать "симбиотические" отношения с бактериями и благодаря этому дольше находиться в кишечнике животных, хотя, очевидно, существуют и другие факторы, которые влияют на скорость их выведения из организма животных.

Ключевые слова: дисбиоз, нормальная микрофлора, антибиотики, энтеровирусы.

ENTEROVIRUSES DISEASES MODELING IN LABORATORY MICE WITH DYSBIOSIS

V.A. Ponyatovsky, V.V. Bobyr, V.B. Nastenko
Bogomolets National Medical University,
Kiev, Ukraine

Summary. The experimental work is devoted to modeling the enteroviral infections in animals with dysbiotic dysfunctions of intestine. As enterovirus, a vaccine strain of serotype 2 poliovirus was selected. The white 30 days old mice of Balb/c line that passed acclimatization were taken as an experimental model. Dysbiosis was formed by oral injection of combination of antibacterial preparations ampicillin and metronidazole in doses of 5, 10 and 20 mg/animal a day.

The results of the researches showed that after oral injection of complex of ampicillin and metronidazole in laboratory animals formed pronounced dysbiosis. The optimum dose for modeling dysbiosis with these preparations was determined as 10 mg/animal. It was established that increasing the dose of antibacterial preparations does not impact on depth of dysbiotic displays in mice's intestine and occurs only in decreased animal's body weight.

In addition, it is experimentally proved that the development of dysbiosis in mice promotes more rapid release of intestinal type 2 poliovirus. The term of virus's evacuation in such animals lasted for 5-6 days, while in control group it took up to 10 days. It is suggested that bacterial cells might "mask" the viruses from the factors of immune protection and decrease of number of bacteria in the intestine after antibiotic therapy accelerates the ongoing release of the organism from viral antigens. It is possible that viruses are able to establish "symbiotic" relations with bacteria and, thus, stay longer in the intestine of animals, although, obviously there are other factors that affect the rate of excretion of viral antigens from animals' organisms.

Key words: dysbiosis, normal microflora, antibiotics, enteroviruses.