

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ім. І. І. МЕЧНИКОВА  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

**БУКІНА ЮЛІЯ ВЯЧЕСЛАВІВНА**



УДК: 579.842.14:616.34-008.87-092:577.27

**САЛЬМОНЕЛА-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ КИШКОВОГО МІКРОБІОМУ І  
ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНІВ *FFAR 2*, *FOXP 3* І *ROR $\gamma$ t* ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ**

03.00.07 — мікробіологія

**Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук**

**Харків – 2020**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор **Камишний Олександр Михайлович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор **Савінова Олена Михайлівна**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, професор кафедри клінічної імунології та мікробіології;  
доктор медичних наук, професор **Коваль Галина Миколаївна**, ДВНЗ «Ужгородський національний університет» МОН України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та епідеміології з курсом інфекційних хвороб.

Захист дисертації відбудеться « 22 » жовтня 2020 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 при ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська 14-16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська 14-16.

Автореферат розісланий « 21 » вересня 2020 року.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
к. мед. н., ст. н. с.



І. А. Воронкіна

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сучасному етапі, не зважаючи на багаторічну історію активного вивчення інфекцій, спричинених сальмонелами, та величезну кількість наукових праць, присвячених вивченню їх збудника, як біологічного виду, сальмонельоз залишається актуальним питанням у галузі охорони здоров'я людей у всьому світі. Формування резистентності до основних антибактеріальних препаратів призводить до зростання епідемічних спалахів практично на всіх континентах, що породжує високу вірогідність невдачі емпіричної антибіотикотерапії (Ubeda C., 2012, Finley R. L., 2013).

Важливою особливістю сальмонел є здатність впливати на мікробіом кишечника - найскладнішу екосистему, що складається з численних видів бактерій, які беруть участь у розвитку вродженої й адаптивної імунної відповіді в слизовій оболонці кишечника, в захисті організму від збудників бактеріальних кишкових інфекцій (Arumugam M., 2011).

Слід зазначити, що молекулярні механізми взаємодії сальмонел з клітинами організму господаря і представниками аутохтонної мікрофлори визначають характер активації вроджених та адаптивних ланок кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) і впливають на результат інфекційного захворювання (Bereswill S., 2011, Purchiaroni F., 2014).

Показовим є те, що окремі представники кишкової мікрофлори впливають на функціональний стан КАЛТ і диференціювання субпопуляцій Т-клітин. Так, наприклад, полісахарид А (PSA) *Bacteroides fragilis* стимулює утворення Т-регуляторних клітин (Treg) і продукцію супресорного цитокіну ІЛ-10 (Macía L., 2015, Vogt S. L., 2015). Ще одним важливим фактом є здатність *B. fragilis* змінювати кількість ключових імунорегуляторних бактерій, які впливають на баланс Th17/Treg в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині (Geem D., 2014).

Метаболіти *B. fragilis* – коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), здатні активувати клітини КАЛТ через рецептор *FFAR 2* та впливати на функціональну активність нейтрофілів, а саме, на вивільнення позаклітинних пасток (НПП або NETs), що обумовлює зниження сальмонела-індукованого запалення кишечника (Pieterse E., 2016, Theocharis K., 2016, Kim M. H., 2013, Corrêa-Oliveira R., 2016).

Таким чином, вивчення процесів взаємодії представників роду *Salmonella* з представниками нормальної мікрофлори кишечника має медичну й соціальну значущість, а їх розкриття та поглиблене дослідження залишаються досі актуальними.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького

державного медичного університету МОЗ України. Представлені дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Молекулярно-генетичний аналіз змін транскриптому генів імунної відповіді і кишкового мікробіому в умовах експериментальної патології та розробка методів їх корекції» (№ держреєстрації 0118U007141). Дисертантом самостійно проведені бактеріологічні, молекулярно-генетичні, морфометричні, патофізіологічні, мікроскопічні, імунофлюоресцентні, хромато-мас-спектрометричні методи аналізу, комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз, статистичний аналіз отриманих результатів.

**Мета і завдання дослідження.** *Мета* - з'ясування закономірностей сальмонела-індукованих змін кишкового мікробіому та транскрипції генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *ROR $\gamma$ t* імунної відповіді щурів на тлі введення ванкоміцину і в умовах корекції *B. fragilis*.

Для досягнення мети були поставлені такі **завдання**:

1. Провести бактеріологічний аналіз видових та кількісних змін пристінкового кишкового мікробіому у самців щурів лінії Вістар у контролі, до та після введення ванкоміцину, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* та *B. fragilis*.

2. Визначити частоту зустрічання генів резистентності до карбапенемів, цефалоспоринів у фенотипово резистентних штамів мікроорганізмів родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacteroidaceae* та до глікопептидів у представників родин *Enterococcaceae* і *Peptostreptococcaceae* у пристінковому вмісті кишечника щурів.

3. Здійснити молекулярно-генетичний аналіз видових та кількісних змін пристінкового кишкового мікробіому у самців щурів лінії Вістар у контрольній та експериментальних групах.

4. Встановити розподіл ключових імунорегуляторних бактерій і їх вплив на транскрипційну активність генів *Foxp 3* і *ROR $\gamma$ t* у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів в цих же експериментальних групах.

5. Визначити особливості експресії генів ефекторних білків сальмонел *Sip A*, *Sop B*, *SopE 2* та особливості формування нейтрофільних позаклітинних пасток у крові і КАЛТ при сальмонела-індукованому запаленні на тлі введення ванкоміцину і *B. fragilis*, а також визначити концентрацію КЛЖК у пристінковій мікрофлорі щурів.

*Об'єкт дослідження* — кишковий мікробіом, сальмонели, КАЛТ.

*Предмет дослідження* — структура пристінкової мікрофлори кишечника, сальмонельозна інфекція, транскрипційна активність генів імунної відповіді в КАЛТ щурів.

**Методи дослідження:** бактеріологічні (виділення чистих культур

мікроорганізмів, їх ідентифікація та визначення чутливості до антибіотиків), мікроскопічні (визначення мікроорганізмів за їх морфологічними і тинкторіальними ознаками), патофізіологічні (моделювання сальмонел-індукованного запалення (СІЗК)), морфометричні (визначення площі і периметру клітин), імунофлюоресцентні (ідентифікація імунопозитивних клітин), хромато-мас-спектрометричні методи аналізу (визначення концентрації КЛЖК), молекулярно-генетичні методи (кількісне визначення мікроорганізмів, виявлення генів резистентності до антибіотиків та оцінка відносного рівня мРНК за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР-РЧ)), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз (розрахунок кількості імунопозитивних клітин), методи статистичного аналізу отриманих результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** При моделюванні експериментальної патології вперше встановлено, що введення *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* на тлі передоброби ванкоміцином викликає збільшення рівня мРНК експресії ефекторних білків сальмонел *Sip A*, *Sop B*, *SopE 2* і гену *Roryt*, що свідчить про розвиток прозапальних реакцій у кишечнику. При корекції СІЗК за допомогою введення культур *Bacteroides fragilis* спостерігається збільшення рівня мРНК генів *FFAR 2* і *Foxp 3* та зменшення експресії гену *Roryt*, що доводить здатність *B. fragilis* зменшувати запалення у кишечнику.

Вперше доведено, що збільшення концентрації КЛЖК стимулює утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП) у щурів при СІЗК і сприяє зменшенню прозапальних реакцій у кишечнику щурів.

Вперше з'ясовано, що в умовах СІЗК відбуваються зміни ключових імунорегуляторних бактерій, а саме: збільшення рівня *SFB* ( $p \leq 0,0001$ ) і суттєве зменшення *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0017$ ), *Bacteroides+Prevotella group* ( $p \leq 0,0002$ ;  $p \leq 0,0002$ ), *Clostridium cluster IV* ( $p \leq 0,0046$ ). При введенні тваринам *B. fragilis*, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином, зменшувались рівні *SFB* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) і мРНК транскрипційного фактора *Roryt+* на 70 %, а також значно збільшувалось представництво *Bacteroides-Prevotella group* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ), *Clostridium spp.* кластерів XIV ( $p \leq 0,0151$ ;  $p \leq 0,0021$ ), і IV ( $p \leq 0,0019$ ;  $p \leq 0,0005$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0166$ ) та експресія мРНК генів *Foxp 3+* у 2,5 і 85 разів.

Вперше встановлено відмінність видових та кількісних показників мікробіоценозу кишківника у щурів при введенні сальмонел на тлі передоброби ванкоміцином, що зумовлює більш швидку інвазію патогену в епітеліоцити і супроводжується зростанням чисельності сальмонел,

псевдомонад, клебсієл, ентеробактерів, ацинетобактерів та зменшенням кількості бактероїдів, фекального ентерококу, пептострептококів, стафілококів, біфідобактерій.

Вперше експериментально доведено, що при корекції СІЗК за допомогою введення культур *Bacteroides fragilis* спостерігається відновлення мікробіоценозу за рахунок збільшення вмісту бактероїдів, фекального ентерококу, пептострептококів, стафілококів, біфідобактерій та зменшенням кількості сальмонел, псевдомонад, клебсієл, ентеробактерів, криптококів, ацинетобактерів, що сприяє зниженню запальних реакцій у кишечнику тварин.

**Практичне значення одержаних результатів.** З урахуванням впливу полісахариду А *B. fragilis* на відновлення кількісного та видового складу кишкового мікробіому, а також на функціональний стан КАЛТ метаболітів *B. fragilis* — КЛЖК, у вигляді активації клітини КАЛТ через рецептори *FFAR 2*, відбувається стимуляція утворення Трег-клітин та зміна рівня мРНК *Foxp 3* і *ROR $\gamma$ t*, що призводить до зменшення прозапальних реакцій у кишечнику тварин. Отримані дані дозволяють рекомендувати використання культур *B. fragilis* у якості можливої ад'ювантної терапії у поєднанні з антибактеріальними препаратами у схемі лікування СІЗК.

Представлені результати можуть бути взяті за основу для конструювання медичних баз даних по відстеженню та аналізу змін біологічних властивостей *Salmonella enteritidis* і *Salmonella typhimurium* в Україні.

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, були впроваджені в практичну діяльність лабораторії загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (акт впровадження від 10.01.20), кафедри військової терапії Дніпропетровської військово-медичної академії (акт впровадження від 15.01.20), в навчальний процес кафедр мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології (акт впровадження від 05.12.19) та інфекційних хвороб (акт впровадження від 20.01.20) Дніпропетровської медичної академії, кафедри мікробіології, вірусології та імунології (акт впровадження від 21.01.20) Харківського національного медичного університету; кафедр дитячих інфекційних хвороб (акт впровадження від 10.01.20) та інфекційних хвороб (акт впровадження від 10.01.20) Запорізького державного медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** При проведенні експерименту особистий внесок здобувача полягав у проведенні патентно-інформаційного пошуку, аналізі літературних даних, виконанні експериментальної частини, бактеріологічних, мікроскопічних, патофізіологічних, морфометричних, імунофлюоресцентних, молекулярно-генетичних (ПЛР-РЧ), хромато-мас-

спектрометричних (ХМСА) методів аналізу, комп'ютерного аналізу зображень і математичного класифікаційного аналізу, методу статистичного аналізу отриманих результатів, у формулюванні висновків. Вибір теми, визначення мети і задач наукового дослідження, розробка методичних підходів та вибір методів дослідження, аналіз і теоретичне узагальнення результатів виконані спільно з науковим керівником.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих зі співавторами працях наводиться за текстом дисертації та в авторефераті у списку фахових публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені та обговорені на конференціях і форумах: «Сучасні аспекти медицини і фармації — 2016» (Запоріжжя, 2016); «Сучасні аспекти медицини і фармації — 2017» (Запоріжжя, 2017); «Молекулярна діагностика» (Москва, 2017), 5th Joint Conference of MICROBIOLOGY AND INFECTION (Wuerzburg, Germany, 2017); «Сучасні аспекти медицини і фармації — 2018» (Запоріжжя, 2018); «Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів, гінекологів, репродуктологів, урологів, нефрологів, дерматологів, інфекціоністів та сімейних лікарів (за участю міжнародних спеціалістів) – 2019» (Харків – 2019); The 13th International conference “Science and society” (Hamilton, Canada, 2019); «Proceedings of articles the international scientific conference» (Czech Republic, Karlovy Vary, 2019), «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології – 2019» (Київ, 2019), «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського – 2020» (Харків – 2020).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць (4 – моно), з них 7 статей (4 – у наукових фахових виданнях України, 7 — включені до міжнародних наукометричних баз, 3 – Scopus і Web of Science), 1 патент на корисну модель, 10 тез у матеріалах наукових конференцій та форумах.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається зі вступу, розділу огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел із 383 найменувань, з яких 10 написано кирилицею, 373 латиницею. Робота викладена на 246 сторінках, ілюстрована 38 рисунками, 17 таблицями, які займають 13 сторінок.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Огляд літератури.** У огляді літератури, який складається з 4 підрозділів розглянуті основні дані щодо етіологічної значимості,

антибіотикорезистентності сальмонел та їх молекулярних механізмів взаємодії з КАЛТ. Освітлено питання стосовно розвитку СІЗК та охарактеризовано вплив *B. fragilis* на мікробіом кишечника.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження проведені на 120 щурах (самцях) лінії Wistar на базі бактеріологічного і молекулярно-генетичного відділу мікробіологічної лабораторії Запорізького державного медичного університету.

При розтині вилучали ділянки клубової і товстої кишки, брижові лімфовузли та кишковий вміст для подальших досліджень.

Всі піддослідні тварини були розподілені на вісім груп по 15 щурів. Група I — контрольна (інтактна); група II — тварини, яким введено ванкоміцин (модель дисбіозу кишкової мікрофлори) (ТЕВА, Угорщина, № UA/8995/01/02); III та IV групи – введено суспензію мікроорганізмів *S. enteritidis* і *S. typhimurium* (модель СІЗК); V група – отримала ванкоміцин, через 24 год було введено суспензію *S. enteritidis*; VI група – отримала ванкоміцин, через 24 год – суспензія *S. typhimurium*; VII група – ванкоміцин, через 24 год – *S. enteritidis*, потім, через 2 доби від початку дослідження, суспензія *B. fragilis*; VIII група – ванкоміцин, суспензія *S. typhimurium* (24 год), та *B. fragilis* (через 48 год від початку дослідження).

Ванкоміцин тваринам вводили у розрахунку 50 мг на кг ваги тіла, суспензії мікроорганізмів – 15 мл концентрацією  $3 \times 10^8$  КУО/г.

Як матеріал для бактеріологічних досліджень мікрофлори кишечника брали змиви з клубової кишки експериментальних щурів. Для виділення сальмонел застосовували магнієве середовище збагачення, в якому змивну рідину розчиняли 1:10. Висіви з отриманих суспензій робили на вісмут-сульфіт агар (ВСА) (інкубували 37 °С, 48 год) та на середовище Ендо (37 °С, 18-20 год) одразу та через 24 год. Після зростання посівів на живильних середовищах проводили вивчення культуральних ознак колоній та підраховували їх кількість.

Визначення біохімічних властивостей мікроорганізмів проводили на Christensen Citrate Agar, Indol Nitrate Medium, Phenol Red Mannitol Broth, Phenol Red Sucrose Broth, Malat Broth, Acetate Differential Agar, Phenol Red Dextrose Broth, Phenol Red Maltose Broth (HiMedia, Індія).

Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків перевіряли відповідно до вимог Європейського комітету по визначенню чутливості до антимікробних препаратів (EUCAST) (версія 3.1, 29.09.2016.) з використанням диско-дифузійного методу (ДДМ).

Визначення генів резистентності мікроорганізмів до антибіотиків (карбапенемів, цефалоспоринів, глікопептидів) проводили за допомогою ПЛР-



аналізу. Для цього було відібрано 712 фенотипово резистентних штамів мікроорганізмів, виділених при мікробіологічному дослідженні пристінкової мікрофлори. Для виявлення методом ПЛР генів резистентності до антибіотиків застосовували набори реактивів «ФЛУОРОПОЛ-РЧ» («Літех», Росія).

З метою вивчення кількісного та видового складу бактерій методом ПЛР використовували пристінковий вміст. Для кількісного визначення специфічних ділянок бактеріальної ДНК застосовували набори реактивів «ДНК експрес» формату «ФЛУОРОПОЛ-РЧ» («Літех», Росія).

Для аналізу експресії генів використовували метод ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження були фрагменти клубової кишки і дистального відділу товстої кишки. Виділення тотальної РНК із тканини щурів проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («ІЗОГЕН», Росія). Для зворотної транскрипції використовували «Набір реагентів для проведення зворотної транскрипції (ЗТ)» («СИНТОЛ», Москва). Для визначення рівня експресії досліджуваних генів *Foxp 3*, *Rorc* (*Royt*), *FFAR 2* та ефекторних білків сальмонел *Sip A*, *Sop B*, *SopE 2* проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі з використанням набору Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США).

Молекулярно-генетичні дослідження з визначення родової і видової приналежності бактерій проводились методом ПЛР-РЧ з ідентифікацією за генами 16S rDNA. Як матеріал використовували пристінковий вміст кишечника щурів. Кількість кишкових бактерій вимірювали кількісною ПЛР на CFX-96 (BioRad) з використанням SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific).

Матеріалом для проведення імунофлюоресцентного дослідження були зразки слизової оболонки клубової частини кишечника та кров щурів. Для виявлення нейтрофільних пасток використовували люмінісцентний барвник SYTOX™ Green nucleic acid stain (Invitrogen, США), згідно з інструкцією, доданою до набору, та мікроскоп PrimoStar (ZEISS, Німеччина).

Для визначення концентрації КЛЖК використовували метод ХМСА. Як матеріал брали просвітню мікрофлору щурів. Аналіз проводили на приладі liquid chromatography-mass spectrometr (USA).

Отримані результати були опрацьовані за допомогою статистичного пакету ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і StatSoft Statistica v12.

**Отримані результати та їх обговорення.** Отримані під час проведення досліджень дані показали, що антибіотико-індуковані зміни кількісного та видового складу пристінкової мікрофлори зумовлені впливом ванкоміцину на грампозитивні мікроорганізми. При цьому, у порівнянні з контрольною групою,

відбувалось зменшення кількості аутохтонних облигатних анаеробних бактерій (бактероїдів), клостридій, елімінація ентерококів, пептострептококів, стафілококів, біфідобактерій, лактобактерій і збільшення кількості ентеробактерій, протеїв, клебсієл і сальмонел. Зменшення кількості *E. coli* та *Bacteroides* spp. при введенні *S. enteritidis* і *S. typhimurium* супроводжувалось збільшенням у пристінковому вмісті кишківника таких мікроорганізмів, як *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Peptostreptococcus anaerobius*, що відбувалось внаслідок конкурування останніх за мікробіоматерію кишківника.

Введення *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, на тлі попередньої обробки ванкомицином, викликало різку зміну складу мікробіоти у пристінковому вмісті тонкого кишечника у порівнянні з III (*S. enteritidis*) і IV (*S. typhimurium*) експериментальними групами. Так, у V (Vancomycin+*S. enteritidis*) та VI (Vancomycin+*S. typhimurium*) групах спостерігалось достовірне збільшення кількості *Salmonella* spp. та інших ентеробактерій у 60 разів, а також різке зменшення вмісту *Bacteroides* spp. у 9 і 10 разів та *Peptostreptococcus anaerobius* у 20 і 9 разів (V та VI групи). Ці дані свідчать про те, що викликаний ванкомицином дисбаланс пристінкової мікробіоти кишечника полегшує проникнення і колонізацію патогенних мікроорганізмів (*S. enteritidis* і *S. typhimurium*) та сприяє розвитку запальних захворювань кишечника (рис. 1).

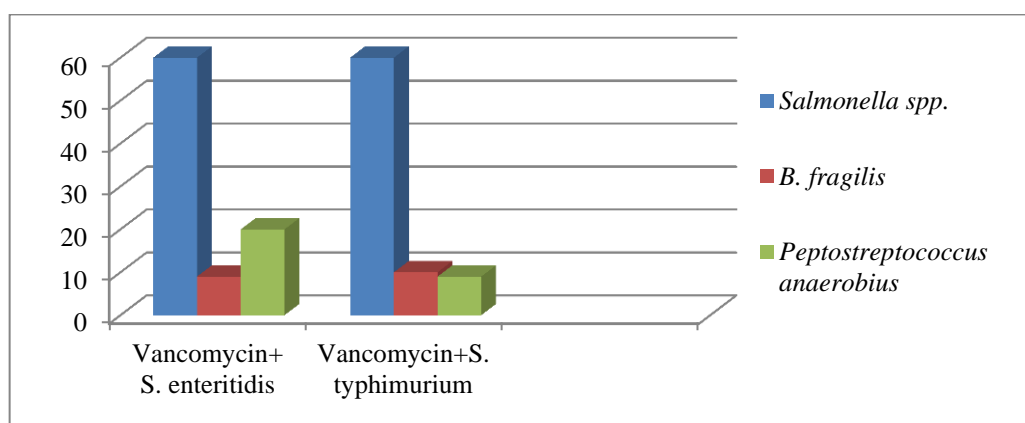


Рис. 1. Порівняльна характеристика певних видів мікроорганізмів у групах Vancomycin+*S. enteritidis* та Vancomycin+*S. typhimurium*.

При введенні експериментальним тваринам *B. fragilis*, які отримували *S. enteritidis* (VII група) та *S. typhimurium* (VIII група) на тлі попередньої обробки ванкомицином, у порівнянні з V (Vancomycin+*S. enteritidis*) та VI (Vancomycin+*S. typhimurium*) групами, спостерігалась зміна кількісного складу мікробіоти у пристінковому вмісті тонкого кишечника, а саме: зменшення кількості *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp.,

*Klebsiella* spp. (у кількох сот разів), а, також, достовірне збільшення в цих групах чисельності *Bacteroides* spp. (у декілька тисяч разів), *E. faecalis*, *E. faecium* у 10 (Vancomycin+S. enteritidis+B. fragilis) і 19 разів (Vancomycin+S. typhimurium+B. fragilis), *Peptostreptococcus anaerobius* - у 7 і 12 разів та *Lactobacillus* spp. - у 27 та 40 разів відповідно (VII і VIII групи) (рис. 2).

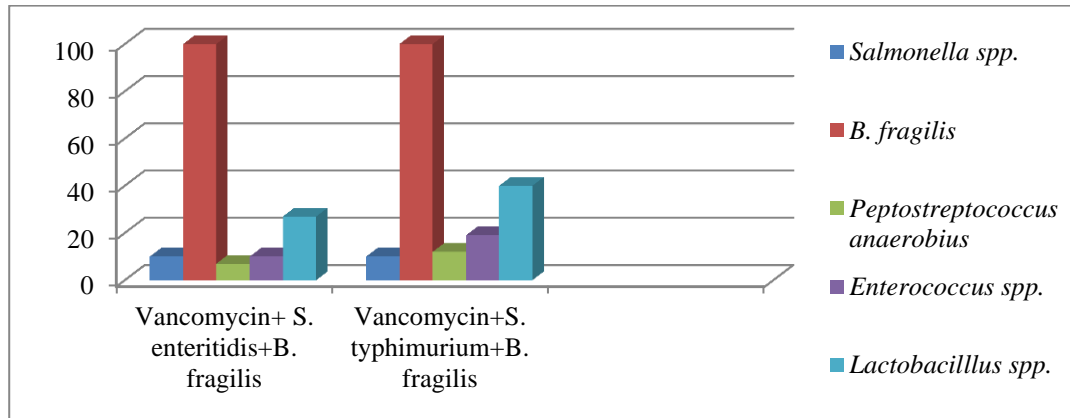


Рис. 2. Порівняльна характеристика певних видів мікроорганізмів у групах Vancomycin+S. enteritidis+B. fragilis та Vancomycin+S. typhimurium+B. fragilis.

При індикації генів резистентності до карбапенемів, цефалоспоринів та глікопептидних антибактеріальних препаратів у фенотипово резистентних мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* гени *KPC*, *OXA-48*, *VIM* і *NDM* визначено у 7,81 %, 8,44 %, 14,14 % і 8,23 % вивчених культур відповідно, у штамів *E. coli* – 6,74 %, 7,87 %, 14,61 %, 4,49 %, *Klebsiella* spp. – 13,85 %, 1,54 %, 15,38 %, 12,31 %, *Salmonella* spp. – 7,03 %, 10,16 %, 13,28 %, 8,59 %, *Enterobacter* spp. – 4,76 %, 14,29 %, 15,87 %, 4,76 %, *Proteus* spp. – 7,89 %, 10,53 %, 14,47 %, 6,58 %; *Bacteroides* spp. – 9,86 %, 4,23 %, 9,86 % і 12,68 % штамів відповідно. При дослідженні ізолятів *P. aeruginosa* виявлено наявність лише гена *VIM* у 15,38 % культур (табл. 1).

Таблиця 1

Індикація генів карбапенемаз у фенотипово резистентних штамів мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	Кількість, абс.ч.	<i>KPC</i>		<i>OXA-48</i>		<i>VIM</i>		<i>NDM</i>	
		абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%	абс. ч.	%
<i>Enterobacteriaceae</i> :	474	37	7,81	40	8,44	67	14,14	39	8,23
<i>E. coli</i>	89	6	6,74	7	7,87	13	14,61	4	4,49
<i>Klebsiella</i> spp.	65	9	13,85	1	1,54	10	15,38	8	12,31

## Продовження таблиці 1

<i>Salmonella</i> spp.	128	9	7,03	13	10,16	17	13,28	11	8,59
<i>Enterobacter</i> spp.	63	3	4,76	9	14,29	10	15,87	3	4,76
<i>Proteus</i> spp.	76	6	7,89	8	10,53	11	14,47	5	6,58
<i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bacteroides</i> spp.	71	7	9,86	3	4,23	7	9,86	9	12,68
<i>Pseudomonadaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	39	0	0	0	0	6	15,38	0	0
<i>Enterococcaceae</i> :	96	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	46	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. faecium</i>	50	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococca-</i> <i>ceae</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp.	32	0	0	0	0	0	0	0	0

Гени резистентності до ванкоміцину при вивченні бактерій роду *Enterococcus* виявлені у 11,46% – *Van A* і 6,25% – *Van B* (табл. 2).

Таблиця 2

Індикація генів *CTX-M*, *Van A* і *Van B* у фенотипово резистентних штамів мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	Кіль- кість, абс.ч.	<i>CTX-M</i>		<i>Van A</i>		<i>Van B</i>	
		абс.ч.	%	абс.ч.	%	абс.ч.	%
<i>Enterobacteriaceae</i> :	474	52	10,97	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	89	8	8,99	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> spp.	65	9	13,85	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	128	18	14,06	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	63	5	7,93	0	0	0	0
<i>Proteus</i> spp.	76	5	6,58	0	0	0	0
<i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bacteroides</i> spp.	71	11	15,49	0	0	0	0
<i>Pseudomonadaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	39	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcaceae</i> :	96	0	0	11	11,46	6	6,25
<i>E. faecalis</i>	46	0	0	5	10,87	4	8,7
<i>E. faecium</i>	50	0	0	6	12,0	2	4,0
<i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp.	32	2	6,25	0	0	0	0

Проведення молекулярно-генетичного методу підтвердило дані, отримані при бактеріологічному аналізі, і довело, що введення ванкоміцину (II група) та *S. enteritidis*, *S. typhimurium* (III і IV групи) приводило до зміни видового і кількісного складу кишкового мікробіому у порівнянні з контрольною групою. При інфікуванні щурів *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, на тлі попереднього введення ванкоміцину, у V (Vancomycin+*S. enteritidis*) та VI (Vancomycin+*S. typhimurium*) експериментальних групах відзначається значне збільшення *Salmonella* spp. у 8 і 46 разів та *E. coli* - у 81 і 139 разів, а також достовірне зменшення кількості *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius* у 40 разів ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з III і IV групами (рис. 3).

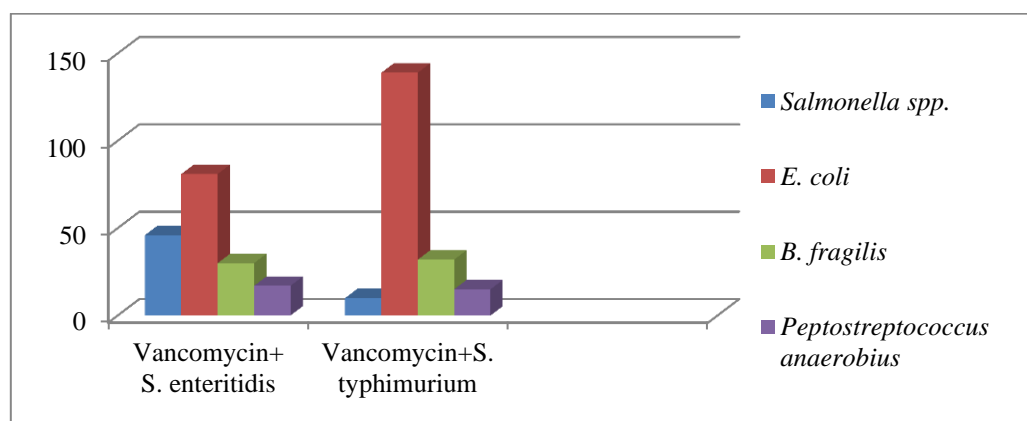


Рис. 3. Порівняння показників певних видів мікроорганізмів у групах Vancomycin+*S. enteritidis* та Vancomycin+*S. typhimurium* (ПЛР-РЧ).

Проте введення *B. fragilis* тваринам викликало у VII (Vancomycin+*S. enteritidis*+*B. fragilis*) та VIII (Vancomycin+*S. typhimurium*+*B. fragilis*) експериментальних групах достовірне зменшення вмісту *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. ( $p \leq 0,05$ ) (у 30 разів), а чисельність *E. faecalis*, *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides* spp. збільшувалась у 20 разів ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з V та VI групами (рис. 4).

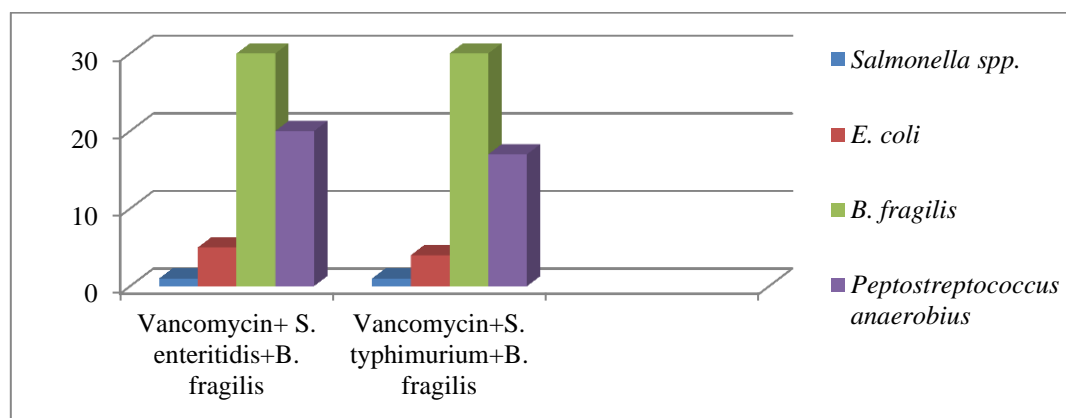


Рис. 4. Порівняльна характеристика певних видів мікроорганізмів у групах Vancomycin+*S. enteritidis*+*B. fragilis* та Vancomycin+*S. typhimurium*+*B. fragilis* (ПЛР-РЧ).

Визначення кількості імунорегуляторних бактерій показало, що введення шурам ванкомицину і сальмонел (V та VI групи) викликало збільшення рівня *SFB* ( $p \leq 0,0001$ ) і суттєве зменшення *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0017$ ), *Bacteroides+Prevotella group* ( $p \leq 0,0002$ ;  $p \leq 0,0002$ ), *Clostridium cluster IV* ( $p \leq 0,0046$ ). Введення *B. fragilis* тваринам VII та VIII експериментальних груп, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкомицином, зменшувало рівні *SFB* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) і мРНК транскрипційного фактора *Roryt+* на 70 % у VIII групі (Vancomycin+*S. typhimurium*+*B. fragilis*), а також значно збільшувало представництво *Bacteroides-Prevotella group* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ), *Clostridium* spp. кластерів XIV ( $p \leq 0,0151$ ;  $p \leq 0,0021$ ), і IV ( $p \leq 0,0019$ ;  $p \leq 0,0005$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0166$ ) та експресію мРНК генів *Foxp 3+* у 2,5 (VII група) і 85 (VIII група) разів відповідно (рис. 5, рис. 6).

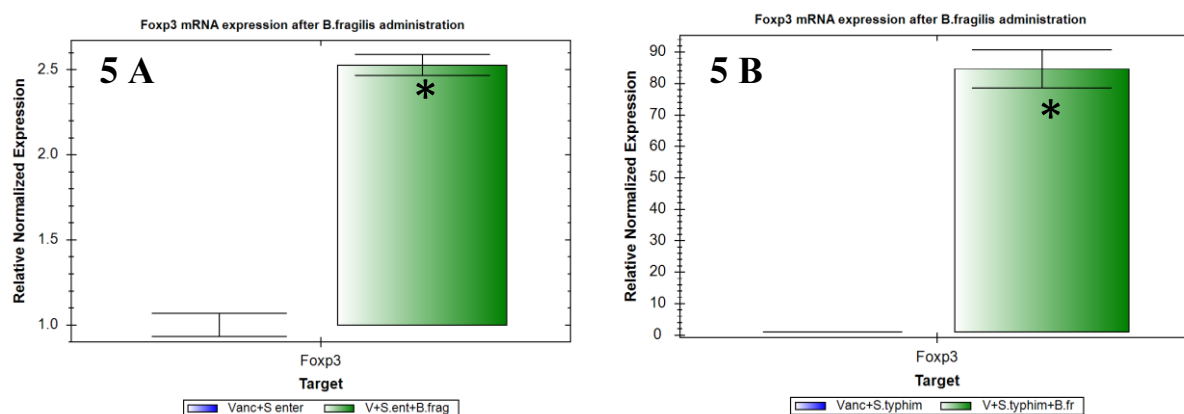


Рис. 5. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Foxp 3* у згрупованих лімфоїдних вузликах клубової кишки шурів після введення *B. fragilis*. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном GAPDH (\* –  $p < 0,05$ ).

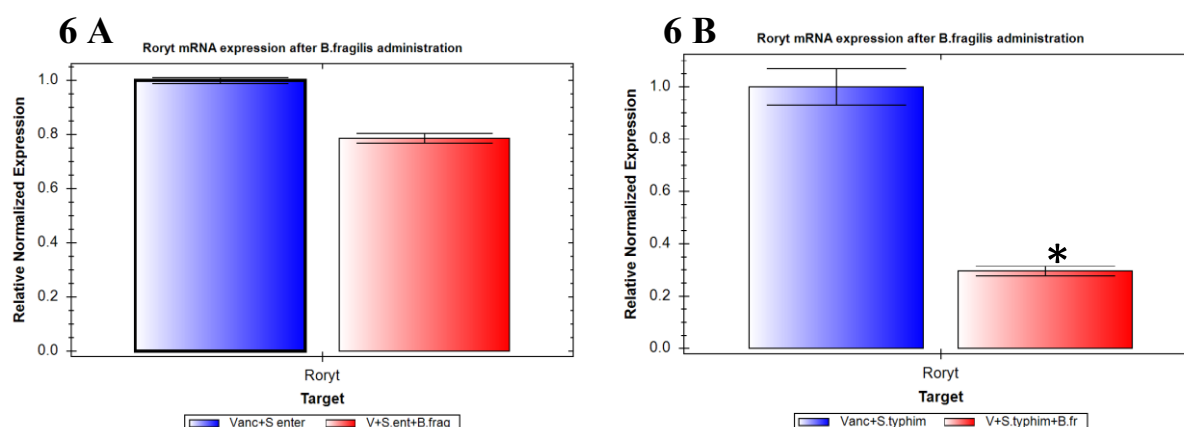


Рис. 6. Відносна нормалізована кількість мРНК гену *RORYt* у згрупованих лімфоїдних вузликах клубової кишки шурів після введення *B. fragilis*. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном GAPDH (\* –  $p < 0,05$ ).

Під час проведення молекулярно-генетичних досліджень нами були визначені рівні експресії генів ефektorних білків *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2* *S. enteritidis* і *S. typhimurium* на тлі попереднього введення ванкоміцину. З'ясувалось, що попередня обробка експериментальних тварин ванкоміцином викликала посилення транскрипційної активності генів *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2*, за винятком *Sip A*, після введення *S. enteritidis*. Так, при порівнянні результатів III групи (*S. enteritidis*) з V групою (Vancomycin+ *S. enteritidis*) спостерігалось зменшення рівня експресії гена *Sip A* у 5 разів ( $p \leq 0,05$ ). Проте при аналізі даних, отриманих при проведенні ПЛР-РЧ, з'ясувалось, що рівень експресії ефektorних білків *Sop B* і *SopE 2* в цих же експериментальних групах статистично достовірно збільшився у 101 і 20 разів ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 7).

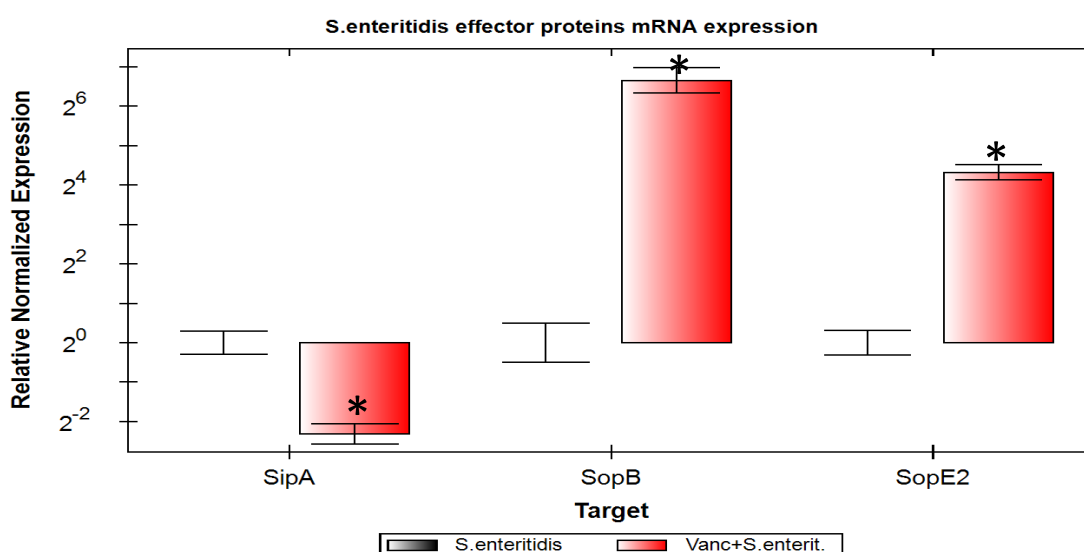


Рис. 7. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Sip A*, *Sop B* і *Sop E* *S. enteritidis* на тлі попереднього введення ванкоміцину. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta C_t$  з референс-геном *Enolase* (\* –  $p < 0,05$ ).

Також при проведенні аналогічних досліджень щодо визначення експресії генів ефektorних білків було з'ясовано, що в VI групі (Vancomycin+*S. typhimurium*) спостерігалось зростання рівня мРНК генів *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2* у порівнянні з результатами, отриманими від IV групи (*S. typhimurium*), і відповідало статистичному збільшенню у 613, 80 і 2 рази відповідно ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 7).

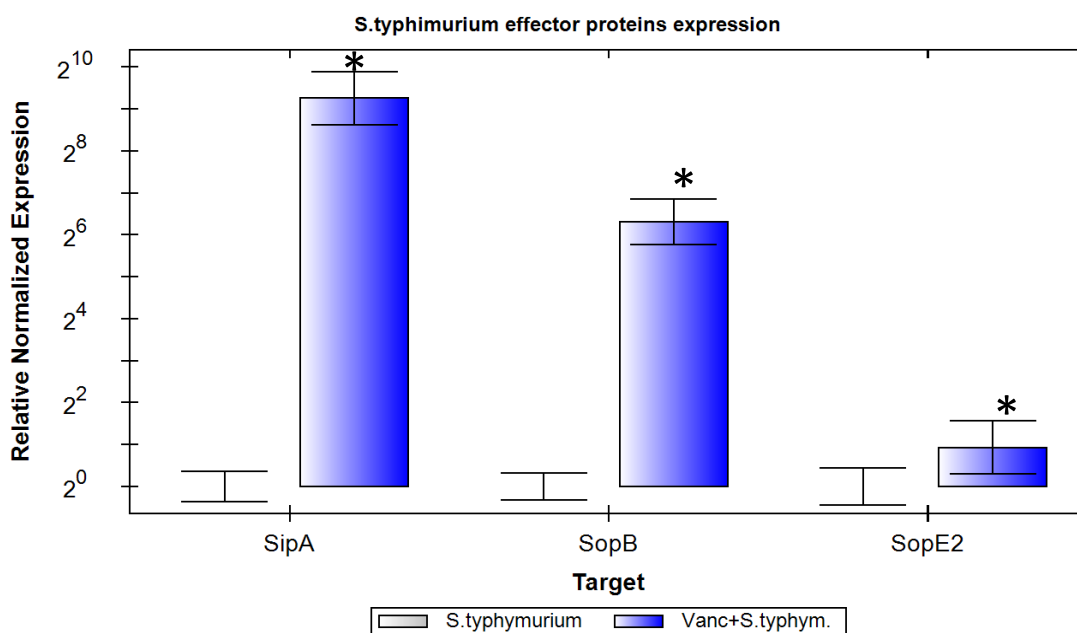


Рис. 7. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Sip A*, *Sop B* і *Sop E* *S. typhimurium* на тлі попереднього введення ванкоміцину. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном *Enolase* (\* –  $p < 0,05$ ).

Визначення рівня експресії мРНК транскрипційного гена *FFAR 2* та порівняння результатів VII групи з даними, отриманими від V групи (Vancomycin+*S. enteritidis*) показало його зростання у 2,7 раза ( $p \leq 0,05$ ). При проведенні аналогічних досліджень в VI (Vancomycin+*S. typhimurium*) та VIII групах спостерігалось достовірне зростання цього показника, що відповідало статистичному збільшенню у 5,4 раза ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 7).

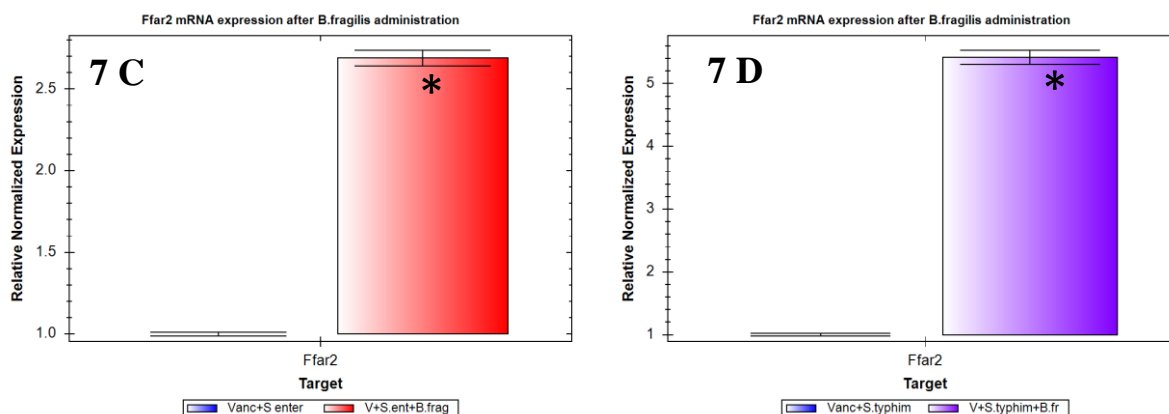


Рис. 7. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *FFAR 2* (C-D) у згрупованих лімфодних вузликів клубової кишки щурів після введення *B. fragilis*. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном *GAPDH* (\* –  $p < 0.05$ ).

Дослідження по визначенню концентрації КЛЖК (ацетату, пропіонату і бутирату) та порівнянні результатів, які були отримані при інфікуванні щурів *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином (VI група), з групою, де



тварини отримували ванкоміцин, сальмонелу тіфімуріум і *B. fragilis*, середня концентрація ацетату в зразках достовірно збільшилась у 2 рази. Визначено, що кількість ацетату у групі VI склала  $1,1 \times 10^{-3}$ , а в групі VIII –  $2,3 \times 10^{-3}$  г/мл. Достовірно визначено, що вміст пропіонату у тварин, які отримали ванкоміцин, *S. typhimurium* і *B. fragilis*, у 6 разів більше, ніж у гризунів в VI групі, яким ввели лише антибіотик з сальмонелою: показники середнього вмісту пропіонату в цих групах дорівнювали відповідно  $4,0 \times 10^{-6}$  та  $2,3 \times 10^{-5}$  г/мл. При визначенні бутирату доведено, що кількість його вмісту у кишечнику тварин групи VIII у 3 рази більше, ніж у щурів VI групи. Відповідно значення склали  $2,0 \times 10^{-6}$  і  $6,0 \times 10^{-6}$  г/мл ( $p \leq 0,05$ ) (табл. 3).

Таблиця 3

Визначення середнього вмісту КЛЖК у просвітній мікрофлорі щурів, г/мл

КЛЖК	Vancomycin+ <i>S.typhimurium</i>	Vancomycin + <i>S. typhimurium</i> + <i>B. fragilis</i>
Ацетат	$1,1 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3*}$
Пропіонат	$4,0 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-5*}$
Бутират	$2,0 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^{-6*}$

Примітка. \* – достовірність відмінностей параметрів  $p \leq 0,05$  відносно групи *S. typhimurium*+*Vancomycin*.

Результати кількісного визначення Sytox+ клітин і НПП із зіскрібків зі слизової оболонки клубового відділу кишечника і в крові показали, що введення ванкоміцину і сальмонел викликало збільшення числа Sytox+ клітин на 30 % і у 2,4 рази, але кількість НПП при цьому знижувалась на 40 % (табл. 4).

Таблиця 4

Середня кількість Sytox+-нейтрофілів і НПП із зіскрібків зі слизової оболонки кишечника і в крові щурів (Total Density (mean)+S.E.M.) у полі зору

Клітини		Control	Vancomycin	Vancomycin+ <i>S. enteritidis</i>	Vancomycin+ <i>S. typhimurium</i>
Sytox+	киш-к	$17,2 \pm 1,9$	$26,7 \pm 2,5^a$	$34,6 \pm 1,9^b$	$63,0 \pm 3,7^b$
НПП	киш-к	$8,7 \pm 0,8$	$8,1 \pm 0,8$	$7,0 \pm 1,0$	$4,9 \pm 0,4^b$
Sytox+	кров	$12,2 \pm 1,0$	$30,0 \pm 1,6^a$	$25,6 \pm 3,7$	$39,0 \pm 2,9^b$
НПП	кров	$7,6 \pm 0,7$	$5,0 \pm 2,4$	$6,2 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,8$

Примітки:

a – достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  відносно контрольної групи;

b – достовірність відмінностей параметрів  $p \leq 0,05$  відносно групи Vancomycin.

Однак введення щурам *B. fragilis* приводило до зменшення чисельності Sytox+ клітин у зіскрібках зі слизової оболонки клубової кишки на 43 % і 53 % і в крові

- на 46 % і 58 %, проте кількість НПП збільшилась на 43 % і в 2,3 раза та на 40 % і в 2 рази відповідно (табл. 5).

Таблиця 5

Визначення середньої кількості клітин Sytox+ нейтрофілів і НПП у щурів при введенні *S. enteritidis*, *S. typhimurium* і *B. fragilis* на тлі попередньої обробки ванкоміцином (Total Density (mean)+S.E.M.) у полі зору

Клітини		Vancomycin + <i>S. enteritidis</i>	Vancomycin+ <i>S. typhimurium</i>	Vancomycin+ <i>S. enteritidis</i> + <i>B. fragilis</i>	Vancomycin+ <i>S. typhimurium</i> + <i>B. fragilis</i>
Sytox+	киш-к	34,6 ± 1,9	63,0 ± 3,7	19,7 ± 1,6*	29,7 ± 2,8*
НПП	киш-к	7,0 ± 1,0	4,9 ± 0,4	10,0 ± 1,0*	11,4 ± 1,9*
Sytox+	кров	25,6 ± 3,7	39,0 ± 2,9	13,8 ± 1,9*	16,3 ± 1,9*
НПП	кров	6,2 ± 0,5	5,0 ± 0,8	8,7 ± 0,9*	9,8 ± 1,2*

Примітка. \* – достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  відносно груп Vancomycin+*S. enteritidis* і Vancomycin+*S. typhimurium*.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та вирішення науково-практичної задачі, що полягає у можливості використання культури *B. fragilis* для корекції патологічних змін кишкового мікробіому при сальмонела-індукованій інфекції.

1. Введення ванкоміцину, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* окремо та на тлі попередньої обробки ванкоміцином, приводило до зміни видового та кількісного складу кишечного мікробіому, як серед аеробної так і анаеробної мікрофлори: збільшення вмісту *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* та достовірного зменшення *Bacteroides* spp., *Proteus* spp., *Peptostreptococcus anaerobius* і *Lactobacillus* spp. Відбувалось зменшення представників головної мікрофлори: бактероїдів, біфідобактерій, лактобактерій до 40 % та збільшення до 100 % супутньої і залишкової груп мікроорганізмів. Корекція мікрофлори щурів *B. fragilis* зменшувала вміст *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. та збільшувала *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Lactobacillus* spp. Коефіцієнт Бергера-Паркера показав: збільшення мікроорганізмів головної групи: *Lactobacillus* spp., біфідобактерій і бактероїдів, до 100 % та супутньої і залишкової мікробіоти ентерококів, *Peptostreptococcus anaerobius* (до 80 %) і стафілококів, грибів роду *Candida* (до 30 %), а також зменшення *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. (до 50 %) і *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Cryptococcus* spp. (до 20 %).

2. У представників родини *Enterobacteriaceae* наявність генів резистентності *KPC*, *OXA-48*, *VIM* і *NDM* визначено у 7,81 %, 8,44 %, 14,14 % і 8,23 % вивчених культур, у штамів *E. coli* – 6,74 %, 7,87 %, 14,61 %, 4,49 %,

*Klebsiella* spp. – 13,85 %, 1,54 %, 15,38 %, 12,31 %, *Salmonella* spp. – 7,03 %, 10,16 %, 13,28 %, 8,59 %, *Enterobacter* spp. – 4,76 %, 14,29 %, 15,87 %, 4,76 %, *Proteus* spp. – 7,89 %, 10,53 %, 14,47 %, 6,58 %; *Bacteroides* spp. – 9,86 %, 4,23 %, 9,86 % і 12,68 % штамів відповідно. При дослідженні ізолятів *P. aeruginosa* виявлено наявність лише гена *VIM* – у 15,38 % культур. При вивченні бактерій роду *Enterococcus* виявлені гени резистентності до ванкоміцину *Van A* у 11,46 % і до *Van B* - у 6,25 %.

3. Результати молекулярно-генетичного дослідження підтвердили дані, отримані при бактеріологічному аналізі, і довели, що введення ванкоміцину та *S. enteritidis*, *S. typhimurium* привело до зміни видового та кількісного складу кишечного мікробіому. При інфікуванні щурів *S. enteritidis* і *S. typhimurium*, на тлі попереднього введення ванкоміцину, відзначається достовірно збільшення *Salmonella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, а також значне зменшення кількості *Proteus* spp., *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*. Введення *B. fragilis* тваринам викликає різке зменшення вмісту *Salmonella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., а чисельність *E. faecalis*, *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides* spp. достовірно збільшується.

4. При введенні щурам ванкоміцину і сальмонел відбувалось збільшення кількості *SFB* ( $p \leq 0,0001$ ) і суттєве зменшення *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0017$ ), *Bacteroides+Prevotella group* ( $p \leq 0,0002$ ;  $p \leq 0,0002$ ), *Clostridium cluster IV* ( $p \leq 0,0046$ ). Введення *B. fragilis* тваринам, які отримували *S. enteritidis* або *S. typhimurium* на тлі попередньої обробки ванкоміцином, зменшувало рівні *SFB* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ) і мРНК *Roryt+* на 70 %, а також значно збільшувало представництво *Bacteroides-Prevotella group* ( $p \leq 0,0001$ ;  $p \leq 0,0001$ ), *A. muciniphila* ( $p \leq 0,0001$ ), *Clostridium* spp. кластерів *XIV* ( $p \leq 0,0151$ ;  $p \leq 0,0021$ ), і *IV* ( $p \leq 0,0019$ ;  $p \leq 0,0005$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0,0166$ ) і експресію генів *Foxp 3+* у 2,5 і 85 разів.

5. Рівень експресії ефекторних білків сальмонел у тварин, при одночасному введенні ванкоміцину і сальмонел, збільшується: *Sop B* - у 101 і 20 разів; *SopE 2* - у 80 і 2 рази; *Sip A* - у 613 разів. Рівень експресії мРНК транскрипційного гену *FFAR 2* зростає у 2,7 і 5,4 раза при введенні *B. fragilis* щурам, передобробленим ванкоміцином, з подальшим інфікуванням *S. typhimurium*, що сприяє збільшенню концентрації КЛЖК ацетату у 2 рази, пропіонату – у 6 разів і бутирату – у 3 рази. Введення ванкоміцину і сальмонел викликає збільшення числа *Sytox+* клітин на 30 % і у 2,4 раза, але знижує кількість НПП на 40 %. Ведення щурам *B. fragilis* приводить до зменшення чисельності *Sytox+* клітин у зіскрібках зі слизової оболонки клубової кишки на

43 % і 53 % і в крові – на 46 % і 58 %, та збільшенню кількості НПП на 43 % і у 2,3 раза та на 40 % і у 2 рази відповідно.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сальмонелла-індуцированые изменения кишечной микробиоты и транскриптома генов иммунного ответа на фоне введения ванкомицина и *Bacteroides fragilis* / Букіна Ю. В., Камишний О. М., Поліщук Н. М., Топол І. О. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 1. С. 12–19. (здобувачем проведено дослідження кількісних і якісних змін кишкового мікробіоценозу методом ПЛР при введенні щурам *S. enteritidis*, *S. typhimurium* та *B. fragilis* на тлі передобробки ванкоміцином, а також визначено рівні експресії мРНК генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *RORyt* та рівні транскрипційної активності ефекторних білків *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2*).

2. The definition of neutrophil extracellular traps and the concentration of short-chain fatty acids in salmonella-induced inflammation of the intestine against the background of vancomycin and *Bacteroides fragilis* / Yu. V. Bukina, B. O. Varynskyi, A. V. Voitovich, G. D. Koval, A. M. Kamyshnyi. *Патологія*. 2018. Т. 15, N 1. С. 10–17. (здобувачем визначені особливості формування НПП у КАЛТ та крові при сальмонела-індукованому запаленні на тлі введення ванкоміцину і *B. fragilis*, а також проаналізована зміна концентрації КЛЖК у просвітній мікрофлорі щурів).

3. Salmonella-induced changes immunoregulatory bacterias and their effect on transcriptional activity of the *Foxp 3* and *Roryt* genes in the GALT of rats / Yuliia Bukina, Marina Thyhonovska, Mariya Koval, Mariya Marushchak, Inna Krynytska, Aleksandr Kamyshnyi. *Iranian Journal of Microbiology*. 2020. Vol. 12, N 3. P. 231–241. (здобувачем визначено вплив імунорегуляторних бактерій на мікробіоценоз кишечника).

4. Букіна Ю. В., Камишний О. М., Поліщук Н. М. Определение спектра генов резистентности к антибиотикам у фенотипически резистентных штаммов пристеночной кишечной микробиоты у крыс методом ПЦР-РВ. *Аннали Мечниковського інституту*. 2016. № 2. С. 21–27. Режим доступу: [www.imiamn.org.ua/journal.htm](http://www.imiamn.org.ua/journal.htm) (здобувачем проаналізовано результати молекулярно-генетичного аналізу по визначенню генів резистентності мікроорганізмів).

5. Букіна Ю. В., Камишний О. М., Поліщук Н. М. Визначення кількісного складу мікробіоти методом ПЛР-РЧ у пристінковому вмісті кишечника щурів. *Інфекційні хвороби*. 2016. № 3 (85). С. 78–81. (здобувачем проведено дослідження кількісних і якісних змін кишкового мікробіоценозу методом ПЛР при введенні щурам ванкоміцину, сальмонели ентеритідіс і тіфімуриум).

6. Молекулярно-генетическая диагностика сальмонелла-индуцированных изменений пристеночной микробиоты кишечника методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / Букіна Ю.В., Камишний О.М., Поліщук Н. М., Топол І. О. *Лабораторна діагностика*. 2017. Т. 6, № 1. С. 43–50. (здобувачем проведено дослідження кількісних і якісних змін кишкового мікробіоценозу методом ПЛР при введенні щурам *S. enteritidis*, *S typhimurium* на тлі передобробки ванкомицином).

7. Букіна Ю. В. Визначення сальмонела-індукованих змін кишкового мікробіому у щурів. *Аннали Мечниковського інституту*. 2020. № 1. С. 18–26. Режим доступу: [www.imiamn.org.ua/journal.htm](http://www.imiamn.org.ua/journal.htm).

8. Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканини : патент на корисну модуль № 102400 Україна. u 201504559 / Камишний О. М., Жереб'ятев О. С., Топол І. О., Деген А. С., Тарасевич (Букіна) Ю. В., Прозорова Т. М., Путілін Д. А., Камишна В. А. ; заявл. 12.05.15. ; опубл. 26.10.15. Бюл. № 20. 4 с. (здобувачем розроблена методика виділення РНК із зразків тканини фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки).

9. Букіна Ю. В., Полищук Н. Н. Изучение генов резистентности к карбапенемам, цефалоспорином и ванкомицину у представителей кишечной микробиоты методом ПЦР-РВ. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016* : збірник тез Всеукраїнської наук.-практ. конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки, 12-13 травня 2016 р. Запоріжжя, 2016. С.8. (здобувачем визначено наявність генів резистентності у мікроорганізмів за допомогою молекулярно-генетичного методу аналізу).

10. Букіна Ю. В., Камишний О. М., Поліщук Н. М. Молекулярно-генетическое определение спектра генов резистентности к антибактериальным препаратам у представителей кишечной микробиоты методом ПЦР-РВ. *Молекулярна діагностика*. Москва, 2017. С.235–236. (здобувачем проведено визначення наявності генів резистентності у мікроорганізмів за допомогою молекулярно-генетичного методу).

11. Bukina Y. V., Kamyshnyi A. M. Determination quantitative composition of the microbiota in parietal intestinal surface in rats by PCR real-time. *Microbiology and infection 2017. 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM VAAM Annual Meeting 2017 69th Annual Meeting of the DGHM*. Wuerzburg, 2017. P.622. (здобувачем проаналізовано зміни кількісних і якісних показників кишкового мікробіоценозу методом ПЛР при введенні щурам ванкомицину, сальмонели ентеритідіс і тифімуриум).

12. Study of expression salmonella effector proteins and transcription activity of genes by RT-PCR / Букіна Ю. В., Камишний О. М., Поліщук Н. М., Топол

І. О. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017* : збірник тез з Всеукраїнської наук.-практ. конференції молодих вчених та з міжнародною участю, присвячена дню науки, 11-12 травня 2017 р.. Запоріжжя, 2017. С.45. (здобувачем визначено рівні експресії мРНК генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *ROR $\gamma$ t* та рівні транскрипційної активності ефекторних білків *Sip A*, *Sop B* і *SopE 2*).

13. Камишний О. М., Букіна Ю. В., Шеєнко О. С. Определение нейтрофильных внеклеточных ловушек и концентрации короткоцепочечных жирных кислот при введении сальмонелл, ванкомицина и *B. fragilis*. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : тези допов. Всеукраїнської наук.-практ. конференції (до 50-річчя заснування ЗДМУ). Запоріжжя, 2018. С.14. (здобувачем проаналізовано особливості формування НПП у КАЛТ та крові, а також, зміну концентрації КЛЖК у просвітній мікрофлорі щурів при сальмонела-індукованому запаленні кишечника).

14. Камишний О. М., Букіна Ю. В. Determination of the level of immunoregulatory bacteria in GALT in rats with salmonella-induced inflammation of the intestine. *Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів* : збірник тез з науково-практичної конференції з міжнародною участю, 16-17 травня 2019 р. Харків, 2019. С.8. (здобувачем проаналізовано вплив імунорегуляторних бактерій на мікробіоценоз кишечника).

15. Букіна Ю. В. The level of immunoregulatory bacteria in galt in rats with salmonella intestinal inflammation. *Proceedings of articles the international scientific conference, 23 august 2019*. Karlovy Vary – Kyiv, 2019. P. 58–60.

16. Букіна Ю. В. The influence of *B. fragilis* on the formation of neutrophil extracellular traps and the concentration of short-chain fatty acids during the administration of salmonella and vankomycin. *Science and society : The 13th International conference, 19 July 2019*. Hamilton, Canada. 2019. P. 76–79.

17. Bukina Y. V., Kamyshnyi A. M. Salmonella-induced inflammation of the intestine and determination of the level of immunoregulatory bacteria in galt in rats. *Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології* : матеріали науково-практич. конф., присвяченої 100-річчю з дня заснування кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ ім. О. О. Богомольця. Київ, 2019. С. 28–29. (здобувачем з'ясовано вплив імунорегуляторних бактерій на мікробіоценоз кишечника).

18. Букіна Ю. В. Quantitative determination of microbiom in the destination content the gut in rats. *Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського* : науково-практична конференція, 12 лютого 2020 р.. Харків, 2020. С. 44.

## АНОТАЦІЯ

**Букіна Ю. В. Сальмонела-індуковані зміни кишкового мікробіому і транскрипції генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *RORγt* імунної відповіді. – На правах рукопису.**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України», Харків, 2020.**

У дисертації узагальнені дані дослідження 120 щурів із сальмонела-індукованою зміною кишкового мікробіому і транскрипції генів *FFAR 2*, *Foxp 3* і *RORγt* імунної відповіді. Проаналізовано зміни складу кишкової мікробіоти щурів при введенні ванкоміцину, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* і *B. fragilis*. Доведено здатність бактероїдів зменшувати прояв СІЗК за рахунок збільшення кількості *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus* spp. та зменшення *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*.

Ідентифіковано гени резистентності до карбапенемів, цефалоспоринів та глікопептидних антибіотиків у мікроорганізмів родин *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Enterococcaceae* і *P. aeruginosa*.

Експериментально доведено вплив імунорегуляторних бактерій, *B. fragilis* на транскрипційну активність генів та концентрацію КЛЖК.

Встановлено вплив ванкоміцину, сальмонел і *B. fragilis* на рівень експресії ефекторних білків сальмонел *Sop B*, *SopE 2*, *Sip A* та на кількість Sytox+ клітин і НПП при СІЗК.

**Ключові слова:** сальмонела, ванкоміцин, мікробіом, експресія, транскрипція генів, корекція мікробіому, *Bacteroides fragilis*.

## АННОТАЦИЯ

**Букина Ю. В. Сальмонелла-индуцированные изменения кишечного микробиома и транскрипции генов *FFAR 2*, *Foxp 3* и *RORγt* иммунного ответа. – На правах рукописи.**

**Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 - микробиология. - ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины», Харьков, 2020.**

В диссертации обобщены данные исследования 120 крыс с сальмонелла-индуцированным изменением кишечного микробиома и транскрипции генов *FFAR 2*, *Foxp 3* и *RORγt* иммунного ответа. Проанализированы изменения состава кишечной микробиоты крыс при введении ванкомицина, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *B. fragilis*. Доказана способность бактероидов уменьшать проявление СИВК за счет увеличения количества *Bacteroides* spp., *E. faecalis*,

*E. faecium*, *Lactobacillus* spp. и уменьшения *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*.

Идентифицированы гены резистентности к карбапенемам, цефалоспорином, гликопептидным антибиотикам у микроорганизмов семейств *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *P. aeruginosa*.

Экспериментально доказано влияние иммунорегуляторных бактерий, *B. fragilis* на транскрипционную активность генов и концентрацию КЦЖК.

Установлено влияние ванкомицина, сальмонелл и *B. fragilis* на уровень экспрессии эффекторных белков сальмонелл *Sop B*, *SopE 2*, *Sip A*, на количество Sytox + клеток и НПП при СИЗК.

**Ключевые слова:** сальмонелла, ванкомицин, микробиом, экспрессия, транскрипция генов, коррекция микробиома, *Bacteroides fragilis*.

## SUMMARY

**Bukina Yu. V. Salmonella-induced changes in gut microbiome and transcription of *FFAR 2*, *Foxp 3* and *ROR $\gamma$ t* genes of immune response. - The manuscript.**

**Thesis for receiving Candidate of Medical Science Degree in the specialty 03.00.07 "Microbiology". - State Institution «I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, 2020.**

The thesis summarises the data from a study of 120 rats with salmonella-induced alterations of the gut microbiome and transcription of *FFAR 2*, *Foxp 3* and *ROR $\gamma$ t* genes of the immune response genes. The features of changes in the composition of rat intestinal microbiota with the administration of vancomycin to rats leads to a decrease in the content of *Bacteroides* spp., *E. faecalis* and *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Candida* spp. and to an increase in *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. Infection of rats *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* changes the quantitative and qualitative composition of the intestinal microbiota compared with the control group, namely: decrease in the content of *Bacteroides* spp., *E. faecalis* and *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *E. coli*, *Candida* spp. and increase in the number of *Salmonella* spp., which indicates the competition of bacteria; It was found that the introduction of *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, against the background of pretreatment with vancomycin, caused more pronounced changes in the composition of the intestinal microbiome, namely: an increase in the content of *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, as well as a sharp decrease in *Bacteroides* spp.,



*Proteus* spp., *Peptostreptococcus anaerobius* and *Lactobacillus* spp. However, when correcting the microflora of rats *B. fragilis*, a sharp decrease in the number of *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Cryptococcus* spp., as well as an increase in *Bacteroides* spp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Lactobacillus* spp., which helped to reduce inflammatory reactions in the intestines of animals.

The presence of resistance genes for carbapenems, cephalosporins, and glycopeptides antibacterials was identified in phenotypically resistant microorganisms of the *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Enterococcaceae* families, non-fermenting gram-negative bacteria. In members of the family *Enterobacteriaceae* the presence of resistance genes *KPC*, *OXA-48*, *VIM* and *NDM* was determined in 7.81%, 8.44%, 14.14% and 8.23% of the studied cultures, in *E. coli* strains - 6.74%, 7.87%, 14.61%, 4.49%, *Klebsiella* spp. - 13.85%, 1.54%, 15.38%, 12.31%, *Salmonella* spp. - 7.03%, 10.16%, 13.28%, 8.59%, *Enterobacter* spp. - 4.76%, 14.29%, 15.87%, 4.76%, *Proteus* spp. - 7.89%, 10.53%, 14.47%, 6.58%; *Bacteroides* spp. - 9.86%, 4.23%, 9.86% and 12.68% of strains, respectively. The study of *P. aeruginosa* isolates revealed the presence of only the *VIM* gene in 15.38% of cultures. In the study of bacteria of the genus *Enterococcus* revealed resistance genes to vancomycin *Van A* - 11.46% and to *Van B* - 6.25%.

The effect of immunoregulatory bacteria on the transcriptional activity of genes has been experimentally proven. In the conditions of salmonella-induced inflammation of the intestine there are changes in key immunoregulatory bacteria, namely an increase in the level of *SFB* ( $p \leq 0.0001$ ) and a significant decrease in *A. muciniphila* ( $p \leq 0.0001$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0.0017$ ), *Bacteroides* + *Prevotella* group ( $p \leq 0.0002$ ;  $p \leq 0.0002$ ), *Clostridium* cluster IV ( $p \leq 0.0046$ ). When administered to animals of *B. fragilis*, which received *S. enteritidis* or *S. typhimurium* on the background of pretreatment with vancomycin, reduced the levels of *SFB* ( $p \leq 0.0001$ ;  $p \leq 0.0001$ ) and mRNA of the transcription factor *Roryt* + by 70%, as well as significantly increased the representation of *Bacteroides-Prevotella* group ( $p \leq 0.0001$ ;  $p \leq 0.0001$ ), *A. muciniphila* ( $p \leq 0.0001$ ), *Clostridium* spp. clusters XIV ( $p \leq 0.0151$ ;  $p \leq 0.0021$ ), and IV ( $p \leq 0.0019$ ;  $p \leq 0.0005$ ), *F. prausnitzii* ( $p \leq 0.0166$ ) and mRNA expression of *Foxp 3+* genes in 2.5 and 85 times.

It was found that the introduction of vancomycin and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* the expression level of effector proteins of salmonella in animals, increases: *Sop B* - in 101 and 20 times; *SopE 2* - in 80 and 2 times; *Sip A* - in 613 times. The mRNA expression level of the transcription gene *FFAR 2* increases in 2.7 and 5.4 times with the introduction of *B. fragilis* to rats pre-treated with vancomycin followed by infection with *S. typhimurium*, which increases the

concentration of SCFA acetate - 2 times, propionate - 6 times and butyrate - 3 times. Administration of vancomycin and salmonella causes an increase in the number of Sytox + cells by 30% and 2.4 times, but a decrease in the number of NETs by 40%. Management of *B. fragilis* rats leads to a decrease in the number of Sytox + cells in scrapings from the mucous membrane of the ileum by 43% and 53% and in the blood by 46% and 58% and an increase in the number of NETs by 43% and 2.3 times and 40% and 2 times respectively.

**Key words:** salmonella, vancomycin, microbiome, expression, transcription genes, correction of microbiome, *Bacteroides fragilis*.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГЕ	геном-еквівалент
КАЛТ	кишково-асоційована лімфоїдна тканина
КЛЖК	коротколанцюгові жирні кислоти
КУО	колонієутворюючі одиниці
МБЛ	метало- $\beta$ -лактамази
НПП	нейтрофільні позаклітинні пастки
СІЗК	сальмонела-індуковане запалення кишечника
FFAR 2	рецептор коротколанцюгових жирних кислот
Foxp3	фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Treg
IL	інтерлейкін
PSA	полісахарид А
ROR $\gamma$ t	фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Т-хелперів 17 типу
SFB	сегментовані нитчаті бактерії
Th17	Т-хелпери 17 типу
Treg	Т-регуляторні клітини