

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ « Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2024 р.

**Дослідження впливу продуктів бактеріального метаболізму на ДНК
та РНК-вмісні віруси в умовах *in vitro***

Кваліфікаційна робота
студентки 4 курсу
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
Кротенко Марія Сергіївна
Науковий керівник від кафедри
Будзанівська І.Г.

Робота виконана в Інституті мікробіології та вірусології імені
Д.К. Заболотного НАН України
під керівництвом к.б.н., Жолобак Н.М.

Оцінка захисту кваліфікаційної роботи

Київ-2024р.

Перелік умовних скорочень

HSV-1 – вірус простого герпесу типу 1

HSV-2 – вірус простого герпесу типу 2

VZV– Varicella-zoster virus (вірус вітряної віспи)

ЦМВ – цитомегаловірус

ВГЛ-6 – вірус герпесу людини типу 6

ВГЛ-7 – вірус герпесу людини типу 7

ВЕБ – вірус Епштейна – Барр

ВГЛ-8 – вірус герпесу людини типу 8

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ВСТУП | 4 |
| РОЗДІЛ 1. Огляд літератури | 6 |
| 1.1. Характеристика досліджуваних ДНК- та РНК-вмісних вірусів..... | 6 |
| 1.1.1. Будова вірусу герпесу..... | 6 |
| 1.1.2. Репродукція вірусу герпесу..... | 9 |
| 1.1.3. Будова вірусу везикулярного стоматиту..... | 12 |
| 1.1.4. Репродукція вірусу везикулярного стоматиту..... | 14 |
| 1.2. Характеристика <i>Bacillus subtilis</i> | 15 |
| 1.3. Бактеріальний метаболізм..... | 17 |
| РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень | 22 |
| 2.1. Матеріали та обладнання, використані у роботі..... | 22 |
| 2.2. Підготовка культури клітин до експерименту..... | 22 |
| 2.3. Приготування робочого розчину ДНК- та РНК-вмісних вірусів..... | 23 |
| 2.4. Дослідження цитопатичної активності..... | 24 |
| 2.5. Дослідження терапевтичної активності..... | 25 |
| 2.6. Дослідження профілактичної активності..... | 25 |
| 2.7. Статистичний облік результатів..... | 27 |
| РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення | 28 |
| 3.1. Візуальна оцінка стану клітин..... | 28 |
| 3.2. Дослідження цитотоксичності зразків клітин <i>Bacillus subtilis</i> | 32 |
| 3.3. Антивірусна активність продуктів бактеріального метаболізму..... | 34 |
| 3.3.1. Вірус везикулярного стоматиту профілактична схема..... | 34 |
| 3.3.2. Вірус везикулярного стоматиту терапевтична схема..... | 35 |
| 3.3.3. Вірус простого герпесу профілактична схема..... | 36 |
| 3.3.4. Вірус простого герпесу терапевтична схема..... | 37 |
| 3.4. Обговорення результатів..... | 38 |
| ВИСНОВКИ | 40 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 41 |

ВСТУП

Вірус простого герпесу (HSV) - дуже поширена вірусна інфекція, яка вражає мільйони людей у всьому світі. HSV спричинює цілий ряд захворювань, включаючи застуду, генітальний герпес і більш важкі стани, наприклад енцефаліт. Незважаючи на широкий вплив HSV на здоров'я населення, сучасні методи лікування обмежуються противірусними препаратами, які спрямовані на реплікацію вірусу, але не повністю усувають його з організму [49].

Також варто звернути увагу на вірус везикулярного стоматиту (VSV), який також викликає значні проблеми. VSV належить до сімейства Rhabdoviridae і зазвичай вражає худобу, але може інфікувати і людей, викликаючи симптоми, схожі на грип. Як і у випадку з HSV, сучасні методи лікування VSV обмежені і здебільшого зосереджені на пом'якшенні симптомів, а не на повному усуненні вірусу з організму.

Тому існує нагальна потреба в альтернативних методах лікування цих вірусів. Одним із потенційних підходів до лікування HSV і VSV є використання метаболізму бактерій. Відомо, що бактерії виробляють широкий спектр метаболітів з антимікробними властивостями, включаючи сполуки, які довели свою ефективність проти вірусів герпесу та везикулярного стоматиту. Ці метаболіти можуть бути використані для пригнічення реплікації та поширення HSV і VSV, впливаючи на ключові етапи їх життєвого циклу.

Метаболізм бактерій - це процес, за допомогою якого бактерії розщеплюють поживні речовини і виробляють різні сполуки, необхідні для їх росту і виживання. Бактерії розвинули складні шляхи метаболізму різних типів поживних речовин, що може призвести до утворення різноманітних вторинних метаболітів з антимікробними властивостями. Ці метаболіти виявилися ефективними проти цілого ряду вірусних і бактеріальних патогенів, включаючи віруси герпесу та везикулярного стоматиту [50].

Потенційне використання бактеріальних метаболітів як противірусних засобів є сферою активних досліджень. Нещодавні дослідження виявили кілька штамів бактерій, які продукують метаболіти з противірусною дією, зокрема *Streptomyces*, *Bacillus* та *Pseudomonas*. Показано, що ці метаболіти пригнічують реплікацію HSV і VSV, впливаючи на різні етапи їх життєвого циклу, включаючи проникнення, реплікацію та збірку вірусу [48].

Саме тому, метою роботи було дослідити потенціал метаболізму бактерій як нового підходу до лікування інфекцій, спричинених HSV і VSV.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика досліджуваних ДНК- та РНК-вмісних вірусів

1.1.1. Будова вірусу герпесу

Родина *Herpesviridae* – середні за розміром ДНК-вмісні віруси, що мають складну будову. Здатні до розмноження в широкому колі хазяїв, включно з людьми, викликають різноманітні захворювання.

Нині, згідно з рішенням Комітету експертів з таксономії та класифікації вірусів, сімейство герпесвірусів поділено, залежно від типу вірусних клітин, на три підродини:

Alphaherpesvirinae (HSV-1, HSV-2, VZV);

Betaherpesvirinae (ЦМВ, ВГЛ-6, ВГЛ-7);

Gammapherpesvirinae (ВЕБ, ВГЛ-8).

Серед усіх відомих вірусів, найбільш поширеним є HSV-1, який, найчастіше, викликає ураження шкіри обличчя та слизових оболонок порожнини рота, червоної облямівки губ. Крім того, він може викликати офтальмогерпес, генітальний герпес, герпетичний енцефаліт та пневмоніти [1].

HSV-2 близький до HSV-1 за морфологічними, антигенними, фізико-хімічними властивостями; він викликає ураження слизових оболонок статевих органів та ділянок шкіри, що прилягають до них. Крім того, він є неонатальним герпесом. В останні роки встановлена етіологічна та патогенетична роль цього вірусу у виникненні раку шийки матки. Обидва ці віруси (HSV-1, HSV-2) належать до сімейства *Alphaherpesvirinae* роду *Simplexvirus*.

Вірус простого герпесу типу 1 (HSV-1) – це сферичні віріони діаметром 150-200 нм. У структурі віріона розрізняють зовнішню оболонку з глікопротеїновими шипами, тегумент, капсид та нуклеоїд.

Далі наведено детальний опис структури HSV-1 (рис.1)

Капсид:

Капсид розташований під зовнішньою оболонкою. Має ікосаедричний (кубічний) тип симетрії, діаметром 125 нм. Складається з 162 капсомерів,

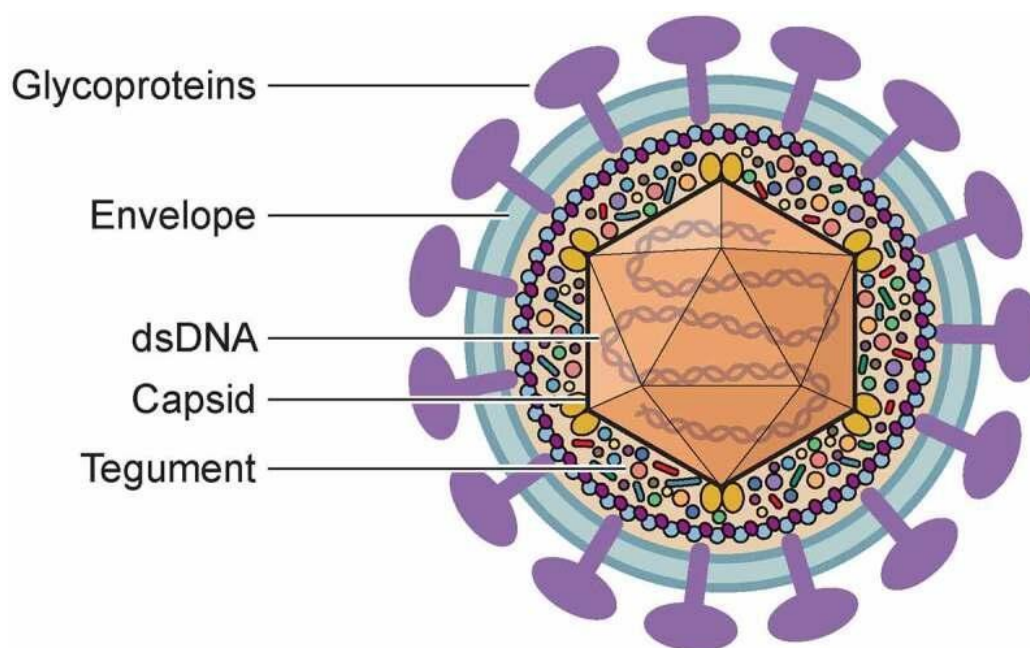


Рис.1. The HSV virion.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8923070/figure/f0001/>

розташованих у симетрії T=16. Містить 3 структурні білки: VP5 (UL19), VP19C, VP23; та два додаткових білка UL17 і UL25.

VP5 (UL19) - це основний капсидний білок, утворює ікосаедричну структуру, що складається з 150 гексонів і 12 пентонів. Пентамери та гексамери VP5 з'єднані між собою гетеротримерами, які називаються триплексами. Ці триплекси утворені однією молекулою VP19C і двома

копіями VP23, які з'єднують мультимери основного капсидного білка VP5.

VP5 (UL19), VP19C, VP23 відповідають за коректне формування та дозрівання капсиду вірусної частки. VP23 відповідає за формування пентонів - структур, які виступають з вершин капсиду.

UL17 та UL25 - це висококонсервативні білки, які містяться у всіх герпес вірусах. Вони є компонентами комплексу CVSC. Дані білки відіграють вирішальну роль у складанні та дозріванні капсиду герпесвірусу.

Тегумент - це набір білків, які присутні в просторі між оболонкою і капсидом. Він містить білки, які забезпечують раннє пригнічення імунної системи та готують клітину-хазяїна до реплікації вірусу. Основні білки: UL7, UL11, UL13, UL16, UL36, UL37, UL51, UL50, UL23, US2.

Тегумент:

Тегументний шар - це білковий шар, який оточує нуклеокапсид і містить різні вірусні білки, що беруть участь у реплікації вірусу та ухиленні від імунітету. Білки оболонки включають вірусні ферменти, такі як ДНК-полімераза та тимідинкіназа, а також регуляторні білки, які контролюють експресію генів і взаємодію вірус-господар. Тегументний шар також містить вірусний білок VP16, який бере участь у експресії вірусних генів і необхідний для реплікації вірусу.

Оболонка:

Оболонка — це ліпідний подвійний шар, що утворюється з мембрани клітини-хазяїна, який оточує нуклеокапсид і тегументний шар. Оболонка містить кілька вірусних глікопротеїнів, які беруть участь у проникненні вірусу в клітини господаря. Найпоширенішими глікопротеїнами є gB, gC, gD і gH/gL. Ці глікопротеїни забезпечують прикріплення та злиття оболонки вірусу з мембраною клітини-господаря. Оболонка також містить ліпіди та глікопротеїни, отримані з клітин-господарів, які можуть

маскувати вірусні антигени та допомагати вірусу уникнути імунної відповіді хазяїна.

1.1.2. Репродукція вірусу герпесу

Цикл репродукції вірусу є складним процесом тривалістю близько десяти годин. У заражених клітинах вірусні білки визначаються вже через 2 години та накопичуються у максимальній кількості приблизно через 8 годин. Вірусна ДНК визначається на годину пізніше, ніж вірусні білки. Вільні зрілі віріони з'являються через 10 годин, досягаючи максимальної концентрації через 15 годин. Після прикріплення до зовнішньої стінки клітин господаря HSV поступово проникає у цитоплазму клітини. У цитоплазмі відбувається дезінтеграція вірусу, вивільнення нуклеїнової кислоти від білкових оболонок. Водночас пригнічується макромолекулярний синтез структур ураженої клітини, що призводить до руйнування її ДНК. У цей час починають утворюватися нові вірусні білки та нуклеїнові кислоти, які пізніше організовуються в єдині структури – нуклеокапсиди, або віронуклеони [23].

Наступним етапом репродукції збудника є синтез безпосередньо ДНК вірусу. ДНК вірусу реплікується напівконсервативно, а для ініціації її синтезу необхідне утворення ранніх білків. Цикл розвитку вірусу завершується диференціюванням, що виражається в покритті нуклеокапсиду ліпідною оболонкою, яка в подальшому виконує і захисну функцію вірусу. В результаті уражена клітина стає гігантською багатоядерною, втрачаючи при цьому свою життєздатність. Вихід вірусу з клітини відбувається між 15 та 18 годинами від початку репродукції. Це призводить до дистрофії верхніх шарів епідермісу (шипуватого та зернистого) в ураженій вірусній ділянці шкірного покриву та слизових,

внаслідок чого утворюються бульбашки різних розмірів. Типовою для ураження HSV є наявність у клітинах внутрішньоядерних включень – еозинофільних тілець або тілець Липшютца [23].

Синтез вірусної ДНК відбувається за участю ензимів (тимідинкінази та ДНК-полімерази вірусного походження), які є мішенями для антивірусної хіміотерапії, зокрема ациклогуанозину. Два відомі типи HSV:

- 1) HSV-1, що викликає ураження шкіри обличчя та верхньої частини тіла;
- 2) HSV-2, відповідальний за більшість випадків генітальної інфекції.

Геноми HSV-1 і HSV-2 досить стабільні порівняно з геномами RNA-вірусів, такими як вірус імунодефіциту людини (ВІЛ-1) або гепатиту С (HCV). Вірус HSV-2 має вищу вроджену частоту мутацій, ніж HSV-1. Мутантні штами можна селекціонувати *in vitro* за допомогою противірусної медикаментозної терапії [15; 28].

Незважаючи на те, що штами HSV-1, отримані від пацієнтів, мають специфічні послідовності нуклеотидів, існує недостатньо даних про варіабельність поверхневих капсидних епітопів до Т-або В-лімфоцитів. Є докази того, що інактивованій вірус або ізольовані вірусні білки можуть активувати процеси вродженого імунітету.

Відомо, що на поверхні Herpes simplex virus (HSV) знаходиться 11 різних мембранних глікопротеїнів; чотири з них – глікопротеїди D, H, L та B – є критичними для його проникнення в клітину, яку він інфікує. На перших етапах розвитку герпесвірусної інфекції глікопротеїд С або глікопротеїд з'єднуються з глікозаміногліканом на поверхні клітини, таким як гепаринсульфат. Взаємодія віріонного глікопротеїду з одним з його рецепторів на поверхні клітини включає механізми проникнення

вірусу, які полягають у злитті вірусної та клітинної мембран, для чого необхідні глікопротеїди В, D, Н та L [24].

Цикл реплікації вірусу HSV є основою для розуміння формування імунітету інфікованих хворих. Наявність поверхневих глікопротеїдів HSV – gB, gD та gH-gL, які необхідні для зв'язування вірусу з мембраною клітини та його проникнення в цитоплазму, забезпечує виникнення герпесвірусного захворювання. Нейтралізуюча активність антитіл, спрямована проти цих білків, була одним з основних аргументів на користь застосування глікопротеїдів HSV як імуногенів для протигерпетичних вакцин [28].

Після початкового зв'язування та проникнення вірусу в клітину необхідна взаємодія gD з одним із кількох високоафінних рецепторів клітин хазяїна.

Вірусні антигени з'являються на інфікованих клітинах за кілька годин після проникнення вірусу в клітину. Поширення HSV із клітини в клітину не завжди супроводжується виходом його в екстрацелюлярний простір. Імунна система ідентифікує інфіковані клітини завдяки розпізнаванню вірусоспецифічних антигенів на їх поверхні. Елімінація внутрішньоклітинного та позаклітинного вірусу потребує синергічної взаємодії специфічних антитіл з ефекторними лімфоцитами, із залученням потужного механізму антитілозалежної цитотоксичності. Той самий механізм набуває чинності, якщо після поділу клітин, у геном яких інтегрований HSV, на їх мембранах з'являються вірусоспецифічні антигени. Протидія герпесвірусної інфекції вимагає від імунної системи хворого на підвищене функціонування системи В-лімфоцитів та інтенсифікації проліферативних процесів у системі лімфопоезу. В-лімфоцити включаються в антитілоутворення, перетворюючись на плазматичні клітини (продуценти антитіл IgM, IgG, IgA) [24].

1.1.3. Будова вірусу везикулярного стоматиту

Вірус везикулярного стоматиту (VSV) відноситься до родини *Rhabdoviridae*, рід *Vesiculovirus*.

Існує два найпоширеніших імунологічних класи VSV: Нью-Джерсі (NJ) та Індіана (IND).

Вірус везикулярного стоматиту є патогенним для великої рогатої худоби, проте для людини патогенність слабо виражена. Передається комарами. VSV має терапевтичний потенціал як протираковий агент та як вакцинний вектор [51, 52].

VSV - це оболонковий, кулеподібний, несегментований вірус 180 нм завдовжки та 75 нм завширшки. Має негативну ланцюгову РНК, що складається з 11 161 нуклеотидів. Геном кодує п'ять вірусних білків в наступній послідовності (3'-N-P-M-G-L-5'): нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G) та РНК-залежну РНК-полімеразу (L).

Далі наведено детальний опис структури VSV (рис.2)

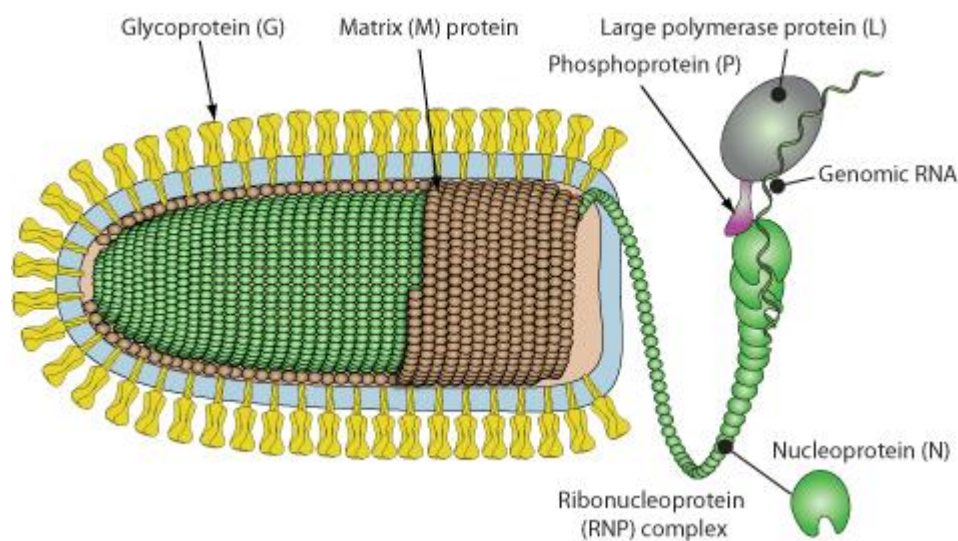


Рис.2. Structure of Vesiculovirus.

https://viralzone.expasy.org/21?outline=all_by_species

Нуклеопротейн:

Нуклеопротейн приймає участь у транскрипції та реплікації, пакуванні вірусної РНК та впливає на структурну стабільність. Нуклеопротейн міцно зв'язується з геномом вірусної РНК, утворюючи комплекси рибонуклеопротейнів (РНП). Дані комплекси захищають вірусну РНК від деградації та слугують шаблонами для транскрипції та реплікації. Для регуляції таких процесів, як транскрипція та реплікація, нуклеопротейн взаємодіє з вірусною РНК-залежною РНК-полімеразою, що забезпечує синтез вірусної мРНК та геномної РНК.

Фосфопротейн:

Фосфопротейн є багатофункціональним білком: є необхідним для транскрипції та реплікації, виступає як кофактор полімерази та як шаперон N0, припускається, що впливає на ухил від вродженого імунітету.

Матричний білок:

Ген М кодує два додаткові поліпептиди, позначені М2 і М3, на додаток до повнорозмірного білка М1 довжиною 229 амінокислот. Матричний білок має важливе значення в інфікуванні клітин вірусом та вірусному цитопатогенезі: пригнічення експресії клітинних генів, індукції округлення клітин та, зрештою, апоптозу.

Глікопротейн:

Даний білок відіграє важливу роль на початкових етапах вірусної інфекції: розпізнаванні специфічних рецепторів на поверхні клітини-хазяїна та злитті мембран.

1.1.4. Репродукція вірусу везикулярного стоматиту

Будучи оболонковим РНК-вірусом з негативним ланцюгом, VSV може інтенсивно реплікуватися в клітинах людини, вірус репродукується у цитоплазмі, в асоціації з білками N, NS, L.

Його цикл реплікації охоплює щонайменше п'ять етапів.

Прикріплення та проникнення вірусу:

Процес реплікації цитоплазматичних вірусів починається з прикріплення вірусних глікопротеїнів G до специфічних рецепторів на поверхні клітини-хазяїна. Це приєднання має вирішальне значення для проникнення вірусу в клітину-хазяїна. Зв'язування G-глікопротеїнів з рецепторами клітини-хазяїна запускає клатрин-опосередкований ендоцитоз - клітинний механізм, при якому мембрана клітини-хазяїна інвагує з утворенням везикули, що поглинає вірус.

Злиття мембран і вихід у цитоплазму:

Потрапляючи всередину клітини-хазяїна в ендоцитарну везикулу, вірусна мембрана зливається з мембраною. Процес злиття необхідний для вивільнення вірусного рибонуклеокапсиду в цитоплазму клітини-хазяїна. Рибонуклеокапсид, який містить геном вірусної РНК, знаходиться в нуклеопротеїнах. Після вивільнення у цитоплазму, розпочинаються такі процеси як: реплікація та транскрипція.

Транскрипція вірусної мРНК:

У цитоплазмі вірусна РНК-залежна РНК-полімераза ініціює транскрипцію вірусного геному. Цей процес включає послідовну транскрипцію вірусної РНК з утворенням вірусних месенджерних РНК (мРНК). Під час транскрипції вірусні мРНК модифікуються за допомогою ковпачкової структури на 5' кінці та поліаденілового хвоста на 3' кінці. Ці модифікації мають вирішальне значення для стабільності та трансляції вірусних мРНК.

Реплікація вірусного геному:

Вважається, що реплікація вірусного геному починається, коли в клітині-хазяїні синтезується достатня кількість нуклеопротейнів. Ці нуклеопротейни інкапсулюють новосинтезовані антигенами та геноми, утворюючи нові рибонуклеокапсиди. Наявність достатньої кількості нуклеопротейнів гарантує, що вірусна РНК належним чином захищена та організована для ефективної реплікації.

Збірка та брунькування нових віріонів:

Новоутворені рибонуклеокапсиди зв'язуються з матричними білками, розташованими на внутрішній поверхні мембрани клітини-хазяїна. Ця взаємодія є критично важливою для складання нових вірусних частинок. Процес складання відбувається за допомогою ендосомального сортувального комплексу, необхідного для транспортування (ESCRT), що знаходиться в клітині-хазяїні. Комплекси ESCRT полегшують вихід нових віріонів з плазматичної мембрани. Коли рибонуклеокапсид зв'язується з матричним білком, вірусні компоненти інкапсулюються і вивільняються з клітини-хазяїна у вигляді нових інфекційних віріонів. Цей процес брунькування характеризує завершення циклу вірусної реплікації, що дозволяє вірусу поширюватися та інфікувати нові клітини.

1.2. Характеристика *Bacillus subtilis*

Більшість бактерій роду *Bacillus* (включаючи *B. subtilis*) не є небезпечними для людини і широко поширені в навколишньому середовищі. Їх виявляють у ґрунті, воді, повітрі та харчових продуктах (пшениця, інші зернові культури, хлібобулочні вироби, соєві продукти, цільне м'ясо, сире та пастеризоване молоко). Як наслідок, вони постійно потрапляють до шлунково-кишкового тракту та дихальних шляхів,

засіваючи ці відділи. Кількість бацил у кишечнику може досягати 107 КУО/г, що можна порівняти з аналогічним показником у *Lactobacillus*. У зв'язку з цим низка дослідників розглядають бактерії роду *Bacillus* як один з домінуючих компонентів нормальної мікрофлори кишечника [32].

Водночас лікувальне введення *B. subtilis* дозволяє використовувати цей мікроорганізм як пробіотик за чотирма основними напрямками: 1) для захисту від кишкових патогенів; 2) від дихальних патогенів; 3) для усунення дисбактеріозу при антибіотикотерапії; 4) для посилення перетравлення та просування їжі.

Пробіотики на основі *B. subtilis* зазвичай приймають перорально у вигляді або спор, або живих бактерій (вегетативних клітин). Виживання спор у шлунково-кишковому тракті не викликає сумнівів у зв'язку з їх високою стійкістю до впливу різних фізико-хімічних факторів, зокрема екстремальних значень рН [25].

У багатьох роботах щодо бактерій роду *Bacillus* було продемонстровано, що після перорального прийому спор спостерігається їх проростання в шлунково-кишковому тракті у вегетативні клітини. Потім спостерігається повторне перетворення на спори (респоруляція). Ці цикли повторюються кілька разів. Зрештою спори з фекальними масами виявляються у зовнішньому середовищі. Аналогічно після перорального прийому вегетативних клітин спостерігається їх споруляція у шлунково-кишковому тракті. Цикли проростання та респоруляції повторюються кілька разів до виведення з організму господаря [21; 35].

Однією з найбільш ефективних бактерій є *B. subtilis*. Унікальність бактерії полягає в тому, що 4-5 % її геному кодує синтез різноманітних протимікробних речовин. Від різних штамів *B. subtilis* було виділено близько 66 таких речовин і перелік продовжує зростати. Більшість протимікробних речовин представлена рибосомально і нерибосомально синтезованими пептидами. У меншій кількості виявляють непептидні

речовини, наприклад полікетиди, аміносахари та фосфоліпіди [30]. Активність багатьох з них спрямована проти грампозитивних бактерій. Крім того, спектр дії охоплює грам-негативні бактерії, віруси та гриби.

Прикладом можуть бути результати дослідження одного з нових штамів *B. subtilis* ВКПМ В-16041 (DSM 24613). Було виявлено високу антагоністичну активність щодо *St. aureus* і *C. albicans*, середню або низьку – щодо *C. freundii*, *E. coli*.

1.3. Бактеріальний метаболізм

Різні штами *B. subtilis* виділяють різний набір протимікробних речовин. Однак у будь-якому випадку спектр антагонізму, що охоплюється, щодо кишкових патогенів виявляється досить широким. Наприклад, штам *B. subtilis* ATCC6633 виділяє субтилін, який є антибіотиком проти грампозитивних бактерій. Інший штам *B. subtilis* A1/3 не виділяє субтилін. Проте він виділяє антибіотик ерицин S, який має той самий механізм дії та спектр активності, що й субтилін [6].

Протимікробні пептиди, що виділяються *B. subtilis*, мають величезну перевагу порівняно з традиційними антибіотиками, оскільки вони близькі до протимікробних пептидів, що виділяються в організмі людини і є частиною його вродженого імунітету. Подібні речовини були ідентифіковані у великій кількості тканин та епітеліальних поверхонь, включаючи шкіру, очі, вуха, ротову порожнину, кишечник, імунну, нервову та сечовидільну системи. Найбільш відомі з них дефензин, лізоцим, кателіцидин, дермцидин, лектин, гістатин та інші [38]. *B. subtilis* виділяють подібні речовини, тому резистентність до них виникає зрідка, побічні ефекти зазвичай відсутні. Відсутність резистентності до протимікробних пептидів людини та *B. subtilis* пов'язують з тим, що їхня

дія частіше спрямована на формування мембранних пор, що призводять до загибелі бактерій. Активність традиційних антибіотиків більше сфокусована на метаболічних ферментах бактерій, що полегшує формування резистентності [6].

B. subtilis посилює захист від кишкових та дихальних патогенів шляхом стимуляції неспецифічного та специфічного імунітету. Неспецифічний імунітет визначають як систему захисту, яка спрацьовує однаково по відношенню до різних мікроорганізмів. Специфічний імунітет працює за принципом «ключ до замку» – для конкретного збудника виробляються спеціальні клітини чи антитіла. Неспецифічний імунітет зазвичай розглядають як першу фазу захисної реакції організму, а специфічний – другу фазу.

У численних дослідженнях було продемонстровано, що введення *B. subtilis* викликає активацію макрофагів [11; 16; 22]. В активованих макрофагах посилюється синтез та вивільнення прозапальних цитокінів: фактора некрозу пухлини α , інтерферону- γ (IFN- γ), інтерлейкіну (IL) 1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, макрофагального білка запалення-2. У результаті розвивається комплексна запальна відповідь, спрямована на знищення патогену. Наприклад, IFN- γ активує макрофаги та захищає клітини від вірусної інфекції. IL-6 стимулює проліферацію та диференціацію В-лімфоцитів, відповідальних за синтез антитіл. IL-8 є потужним хемотаксичним та паракринним медіатором для нейтрофілів. Інфільтрація активованими нейтрофілами відіграє важливу роль у підтримці запалення та окислювального стресу. IL-12 регулює зростання, активацію та диференціацію Т-лімфоцитів [16; 22].

Дослідниками було встановлено [34], що бактерії комутують між собою всередині одного виду та між різними видами за допомогою особливої групи речовин, які називаються кворумчувальними молекулами. Одна з таких молекул, що виділяються *B. subtilis*, отримала

назву фактора компетенції та споруляції (CSF). Перенесення CSF в епітеліальні клітини кишечника активує важливі сигнальні шляхи, необхідні для виживання цих клітин. Насамперед, це p38 MAP-кіназний шлях і протеїнкіназа-B/Akt-шлях. Крім цього CSF індукує синтез білків теплового шоку (Hsps), що запобігають розвитку окислювального стресу в епітеліальних клітинах. Обидва перераховані ефекти – поліпшення виживаності епітеліальних клітин та зменшення окислювального стресу – призводять до підвищення бар'єрної функції слизової оболонки кишківника. Вона стає менш уразливою до дії патогенів.

B. subtilis синтезує ряд вітамінів, зокрема тіамін (B₁), піридоксин (B₆) та менахіон (K₂). Різні штами *B. subtilis* виділяють різний набір амінокислот, деякі з яких є незамінними, наприклад, валін [33].

У багатьох дослідженнях була підтверджена здатність *B. subtilis* викликати активацію та проліферацію Т- та В-лімфоцитів. Це відбувається як у периферичній крові (обидва типи клітин), так і в тимусі (Т-лімфоцити) та селезінці (В-лімфоцити). Крім того, було виявлено пряму здатність стимулювати лімфоцити за рахунок клітинних стінок, пептидогліканів та тейхоєвих кислот *B. subtilis* [7; 10; 31].

У багатьох дослідженнях було продемонстровано позитивний вплив *B. subtilis* на вміст нормальної мікрофлори кишечника. Пробіотик збільшував кількість *Lactobacillus* і знижував вміст *Escherichia coli* у кишечнику та калових масах [17], збільшував рівень *Bifidobacterium* та знижував – *Alistipes spp.*, *Clostridium spp.*, *Roseospora spp.*, *Betaproteobacterium* у калових масах [17]. Отже, введення *B. subtilis* змінювало співвідношення кишкової мікрофлори у бік збільшення кількості нормальних бактерій та зменшення патогенних штамів.

Механізми цього явища продовжують вивчати. Дані, отримані сьогодні, вказують на дві можливості. З одного боку, *B. subtilis* за рахунок вивільнення протимікробних речовин пригнічує розвиток патогенної

мікрофлори, що створює умови для заповнення нормальними бактеріями [10].

Друга можливість пов'язана з прямою стимуляцією *B. subtilis* нормальної мікрофлори кишечника, такої як *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*. На це вказують результати експериментів *in vitro* зі створення змішаних пробіотиків, що містять *B. subtilis* та *Lactobacillus*. Було з'ясовано, що життєздатність лактобацил у таких комбінаціях значно збільшувалася [40; 41].

У 2015 р. спільнота Cochrane опублікувала результати систематичного огляду щодо застосування пробіотиків для попередження гострих респіраторних інфекцій.

Автори дійшли висновку, що пробіотики були ефективнішими за плацебо на 47 %. Крім того, пробіотики зменшували тривалість захворювань на 1,89 дні. Пробиотики можуть дещо знижувати частоту використання антибіотиків.

Безпека *B. subtilis* була протестована за трьома основними напрямками: на наявність патогенних генів, антибіотикорезистентність і точність мікробної ідентифікації [26].

За даними експериментальних та клінічних досліджень, існує ціла низка показань, коли призначення пробіотика на основі *B. subtilis* є доцільним. Насамперед це включення пробіотика до складу комплексної терапії кишкових інфекцій, а також використання його для профілактики респіраторних інфекцій. Пробиотик є корисним при проведенні курсів пероральної або парентеральної антибіотикотерапії для профілактики антибіотикасоційованої діареї. Призначення цих бактерій є важливим при порушеннях перетравлення та просування їжі різного генезу, пов'язаних з похибками в дієті, зміною раціону харчування, хворобами шлунково-кишкового тракту, порушеннями вегетативної нервової системи тощо.

Для пробіотиків на основі *B. subtilis* характерне високе співвідношення ефективності та безпеки [3].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання, використані у роботі

Для визначення активності дії продуктів бактеріального метаболізму була використана перещеплювана культура VERO з музею Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ та як індикатори – вірус простого герпесу 1 та вірус везикулярного стоматиту з музею Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ.

Використанні матеріали:

препарати *Bacillus subtilis* зразок 3; середовище для вирощування клітин DMEM-F12 (Sigma); середовище для вирощування клітин RPMI (Sigma); 0,02% розчин Версену; розчин кристалічного фіолетового 4%; фізіологічний розчин; дезінфікуючий розчин Blanidas 300 (Бланідас); автоматичні піпетки (самплери) на 1000, 20-200, 5-20 та 1 мкл; одноразові наконечники для піпеток; планшети на 96 лунок для культури клітин; скляні флакони; епіндорфи; термостат; світловий мікроскоп; прилад уніскан (планшетний рідер) Labsystem Multiscan FC.

2.2. Підготовка культури клітин до експерименту

Була досліджена антивірусна профілактична активність продуктів метаболізму та антивірусна терапевтична активність (Референсом для проведення цих досліджень став метод ЦПД. Проте відбулися адаптивні зміни в даному методі.) Під час виконання всіх процедур дотримувалися

умови стерильності та особистого захисту. Робота була проведена в вірусологічному боксі.

1) З матрацу з моношаром клітин VERO було злито середовище у дезінфікуючий розчин. Для видалення залишків середовища додали 2,5 мл розчину Версену. Знову злили в дезінфікуючий розчин.

2) Додали ще 6-7 мл розчину Версену, поставили матрац в термостат на декілька хвилин. Після цього клітини мали округлитися та відокремитися одна від одної.

3) Злили частину розчину Версену. Для більш якісного відокремлення клітин від поверхні матраца використали самплер та залишившийся розчин Версену. Розчин виприскували на стінку матрацу під кутом 45°. Розчин помутнів.

4) У пробірці змішали 9 мл середовища для вирощування клітин та 1 мл суспензії знятих клітин. Після чого ресуспендували.

5) Підготували планшет для посадки клітин. Нанесли всі необхідні позначки (дата, культура клітин тощо).

6) В кожен лунку було внесено 100 мкл клітинної суспензії.

7) Помістили дослідний планшет в термостат на 24 години при температурі 37°C.

2.3. Приготування робочих розчинів ДНК- та РНК-вмісних вірусів

1) У флаконі змішали 50 мл поживного середовища (RPMI+DMEM, 1:1) та 200 мкл вірусу HSV 1/2 .

2) У флаконі змішали 50 мл поживного середовища (RPMI+DMEM, 1:1) та 200 мкл вірусу VSV.

3) Було проведено центрифугування зразків клітин *Bacillus subtilis* протягом 10 хв при 14000 об/хв.

2.4. Дослідження цитопатичної активності

1) В дезінфікуючий розчин обережним та швидким рухом виливаємо вміст планшету (культуральне середовище).

2) В лунки контролю клітин вносимо 100 мкл безсироваткового середовища (RPMI+DMEM, 1:1). В усі інші лунки внесли 190 мкл безсироваткового середовища (RPMI+DMEM, 1:1) та 10 мкл зразків клітин *Bacillus subtilis*.

3) За допомогою восьмиканального самплера перенесли 100 мкл з 7 (сьомого) стовпчика в 8 (восьмий), з 8(восьмого) в 9(дев'ятий), повторили дії до 11 рядка. Так само перенесли з 6 (шостого) в 5 (п'ятий) і до 2 (другого). Таким чином найменше розведення зразків буде в 2 (другому) та 11 (одинадцятому) стовпчиках. Перший ряд – контроль клітин.

4) Помістили дослідний планшет в термостат на 24 години при температурі 37°C. Для дослідження впливу метаболітів на клітини після 48 - годин, залишаємо планшет на 48 годин при температурі 37°C.

5) Після інкубації в дезінфікуючий розчин обережним та швидким рухом виливаємо вміст планшету.

6) В кожную лунку додали по 65 мкл розчину кристалічного фіолетового. Залишили на 5-7 хвилин.

7) Видалили залишки фарби та ретельно промили водою, залишили до повного висихання.

8) Провели аналіз за допомогою уніскану при довжині хвилі 540 нм.

2.5. Дослідження терапевтичної активності

1) В дезінфікуючий розчин обережним та швидким рухом виливаємо вміст планшету (культуральне середовище).

2) В лунки контролю клітин вносимо 100 мкл безсироваткового середовища (RPMI+DMEM, 1:1). В усі інші лунки внесли 100 мкл робочого розчину вірусу.

3) Інкубуємо при кімнатній температурі протягом 1 години.

4) В 6 (шостий) та 7 (сьомий) стовпчик додали 20 мкл розчину зразків номер 3 та 5 відповідно. Ще внесли 80 мкл безсироваткового середовища.

5) За допомогою восьмиканального самплера перенесли 100 мкл з 7 (сьомого) стовпчика в 8 (восьмий), з 8(восьмого) в 9(дев'ятий), повторили дії до 11 рядка. Так само перенесли з 6 (шостого) в 5 (п'ятий) і до 2 (другого). Таким чином найменше розведення зразків буде в 2 (другому) та 11 (одинадцятому) стовпчиках. Перший та останній ряд – контроль клітин та контроль вірусу.

6) Помістили дослідний планшет в термостат на 24 години при температурі 37°C.

7) Через добу в дезінфікуючий розчин обережним та швидким рухом виливаємо вміст планшету.

8) В кожен лунку додали по 65 мкл розчину кристалічного фіолетового. Залишили на 5-7 хвилин.

9) Видалили залишки фарби та ретельно промили водою.

10) Залишили до повного висихання.

11) Провели аналіз за допомогою унікану при довжині хвилі 540 нм.

2.6. Дослідження профілактичної активності

1) В дезінфікуючий розчин обережним та швидким рухом виливаємо вміст планшету (культуральне середовище).

2) В усі лунки вносимо 180 мкл безсироваткового середовища (RPMI+DMEM, 1:1) та 20 мкл зразків (6 ряд та 7 ряд – зразки клітин *Bacillus subtilis*).

3) За допомогою восьмиканального саплера перенесли 100 мкл з 7 (сьомого) стовпчика в 8 (восьмий), з 8(восьмого) в 9(дев'ятий), повторили дії до 11 рядка. Так само перенесли з 6 (шостого) в 5 (п'ятий) і до 2 (другого). Таким чином найменше розведення зразків буде в 2 (другому) та 11 (одинадцятому) стовпчиках. Перший та останній ряд – контроль клітин та контроль вірусу.

4) Помістили дослідний планшет в термостат на 24 години при температурі 37°C.

5) Через добу в дезінфікуючий розчин обережним та швидким рухом виливаємо вміст планшету.

6) В лунки контролю клітин внесли по 100 мкл безсироваткового середовища.

В усі інші лунки внесли по 100 мкл робочого розчину вірусу.

7) Повторили процеси з пункту 4 та 5.

8) В кожную лунку додали по 65 мкл розчину кристалічного фіолетового. Залишили на 5-7 хвилин.

9) Видалили залишки фарби та ретельно промили водою.

10) Залишили до повного висихання.

11) Провели аналіз за допомогою уніскану при довжині хвилі 540 нм.

2.7. Статистичний облік результатів

- 1) Отриманні дані з унікану були статистично опрацьовані.
- 2) Було досліджено життєздатність клітин VERO при антивірусній терапевтичній схемі та антивірусній профілактичній схемі.
- 3) Результати представлено в наступному розділі.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Візуальна оцінка стану клітин

Була проведена візуальна оцінка стану клітин VERO у контрольних лунках та стану клітин після 24- та 48-годинного контакту з досліджуваними метаболітами.

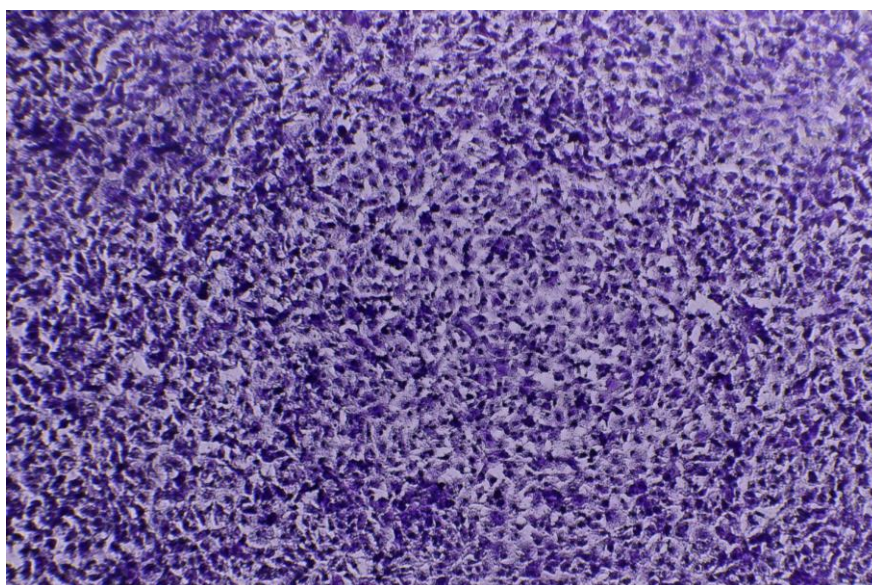
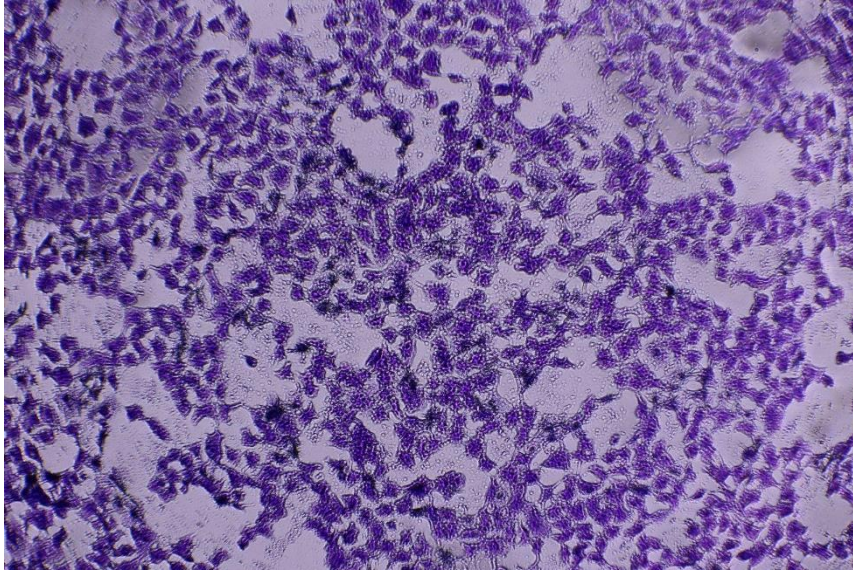
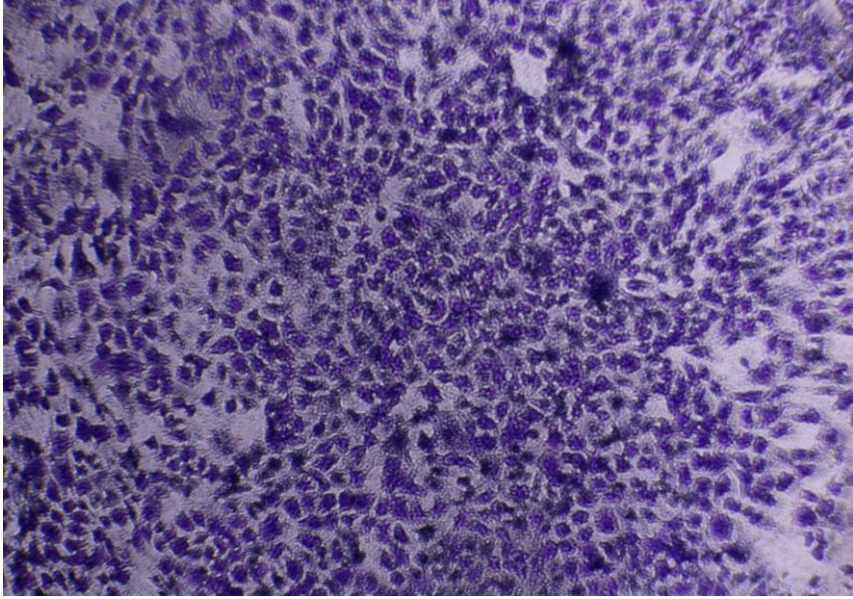


Рис.3.1. Контроль клітин VERO; (збарвлення кристалічним фіолетовим: Об. \times 10, Ок. \times 10)

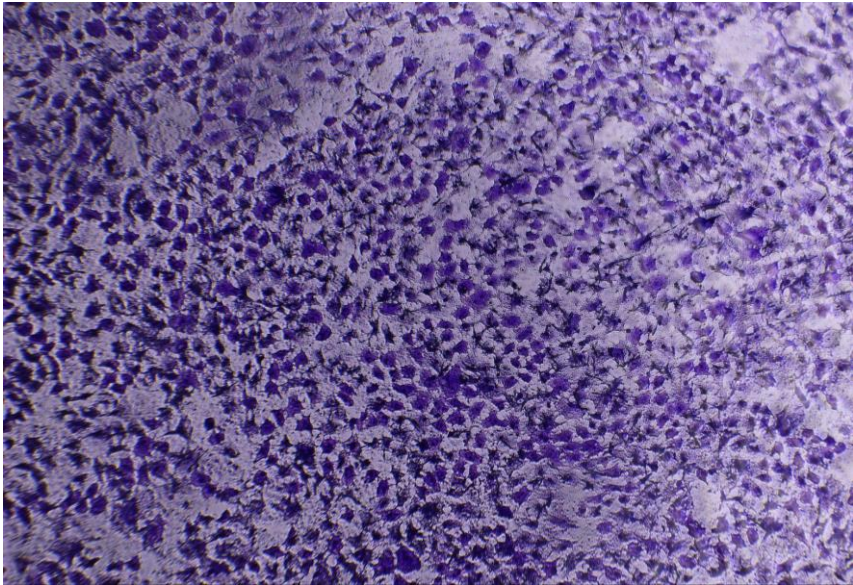
За звичайних умов клітини VERO утворюють щільний моношар з епітеліоцитів, що мають великі темні ядра, які добре помітні під мікроскопом. Ці клітини характеризуються високою адгезією до поверхні культурального флакона, що забезпечує рівномірне розподілення та стабільність моношару.



A



B



B

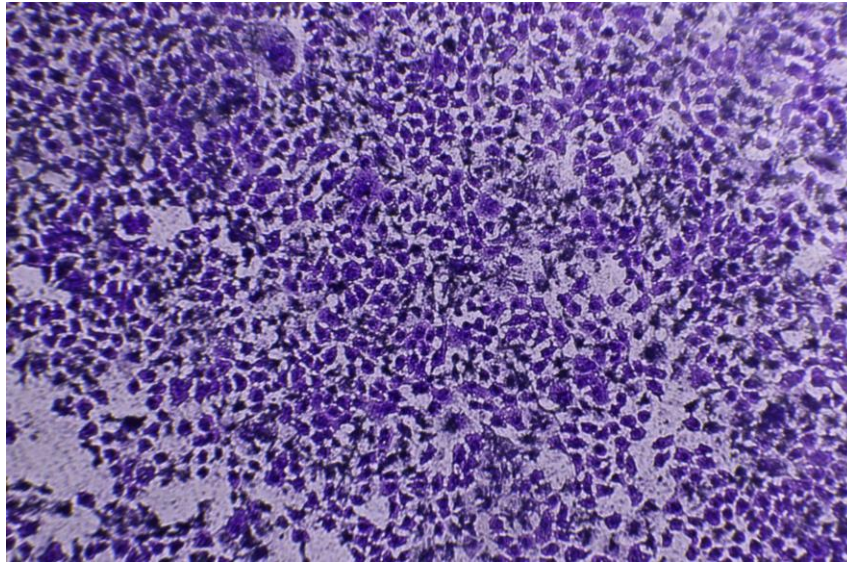
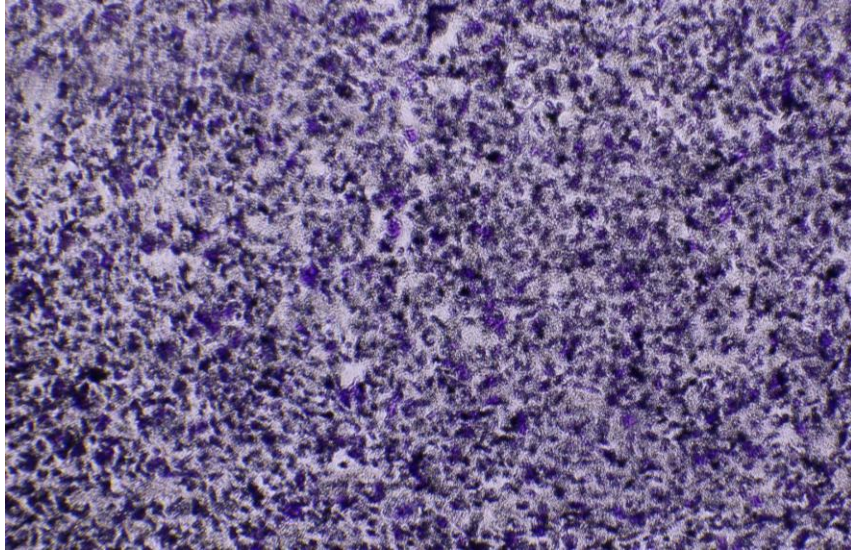
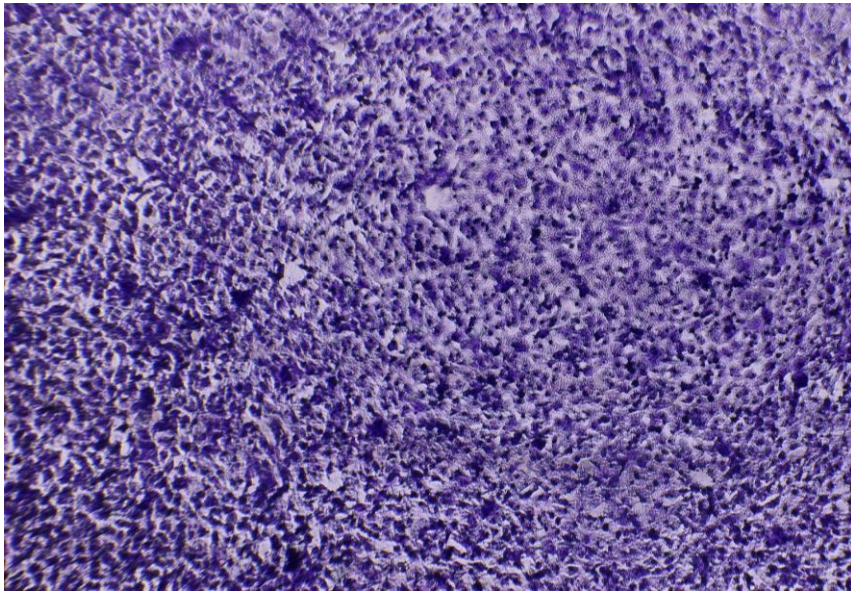


Рис.3.2. Цитопатичний ефект на життєздатність клітин VERO при 24 - годинному контакті з різними розведеннями метаболітів: А - 1:10; Б - 1:40; В - 1:160; Г - 1:320; (забарвлення кристалічним фіолетовим; Об.×10, Ок.×10)

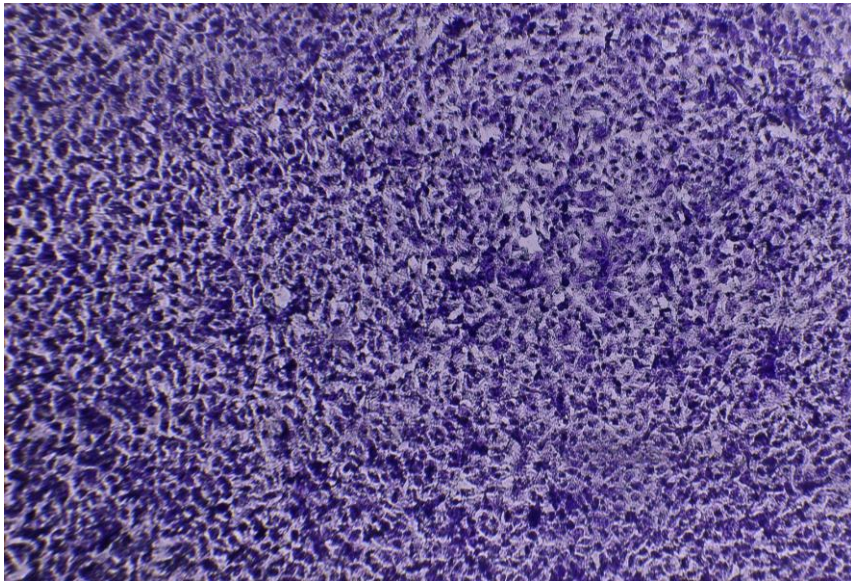
На рис.3.2.А спостерігається округлення клітин, моношар втрачає свою цілісність, що свідчить про токсичність метаболітів при високій концентрації. Відповідно до вище зображених рисунків (Б, В та Г), спостерігаємо збереження цілісності моношару та стану клітин пропорційно до концентрації. Це спостереження демонструє, що при нижчому вмісті метаболітів клітини зберігають свою життєздатність, включаючи форму та цілісність моношару. Нижча концентрація метаболітів має менший токсичний вплив на клітини, що дозволяє їм підтримувати свою структуру та функції.



A



B



B

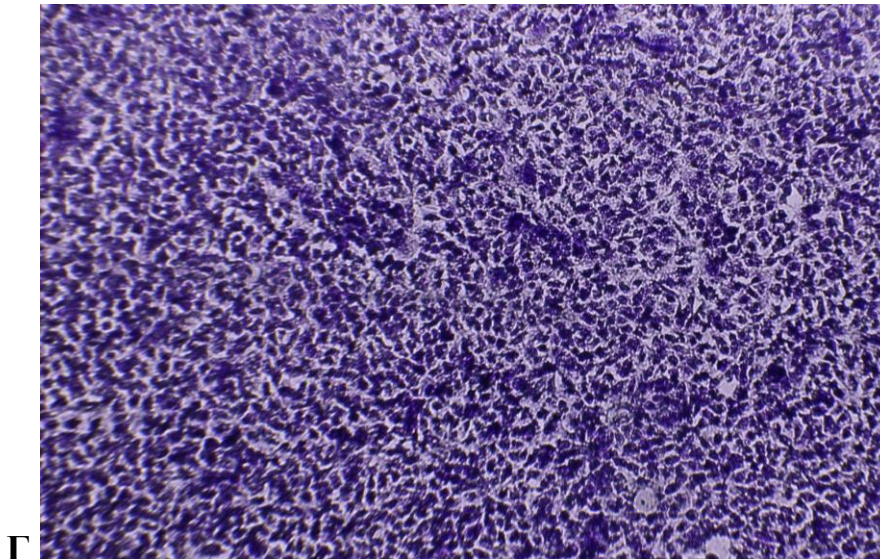


Рис.3.3. Цитопатичний ефект на життєздатність клітин VERO при 48 - годинному контакті з різними розведеннями метаболітів: А - 1:10; Б - 1:40; В - 1:160; Г - 1:320; (забарвлення кристалічним фіолетовим; Об.×10, Ок.×10)

Згідно рис.3.3.А метаболіти в високих концентраціях є токсичними для клітин VERO. Відповідно до наведених зображень (Б, В та Г), видно, що цілісність моношару і стан клітин зберігаються пропорційно до концентрації. За нижчого рівня метаболітів клітини залишаються життєздатними, зберігаючи свою форму та цілісність моношару. Проте варто зазначити, що при контакті 48 годин, клітини здатні до відновлення власної життєздатності. Це може вказувати на активацію захисних механізмів у клітинах при тривалому контакті з подразником, таким як метаболіти.

3.2. Дослідження цитотоксичності зразків клітин *Bacillus subtilis*

Для точнішої оцінки впливу метаболітів бактеріальних клітин на антивірусну активність, було проведено вимірювання оптичної густини

досліджуваних лунок та підрахунок відсотку живих клітин, відносно контрольних інтактних клітин. На основі отриманих даних, нами було побудовані наступні графіки залежності токсичності продуктів бактеріального метаболізму від концентрації метаболітів.

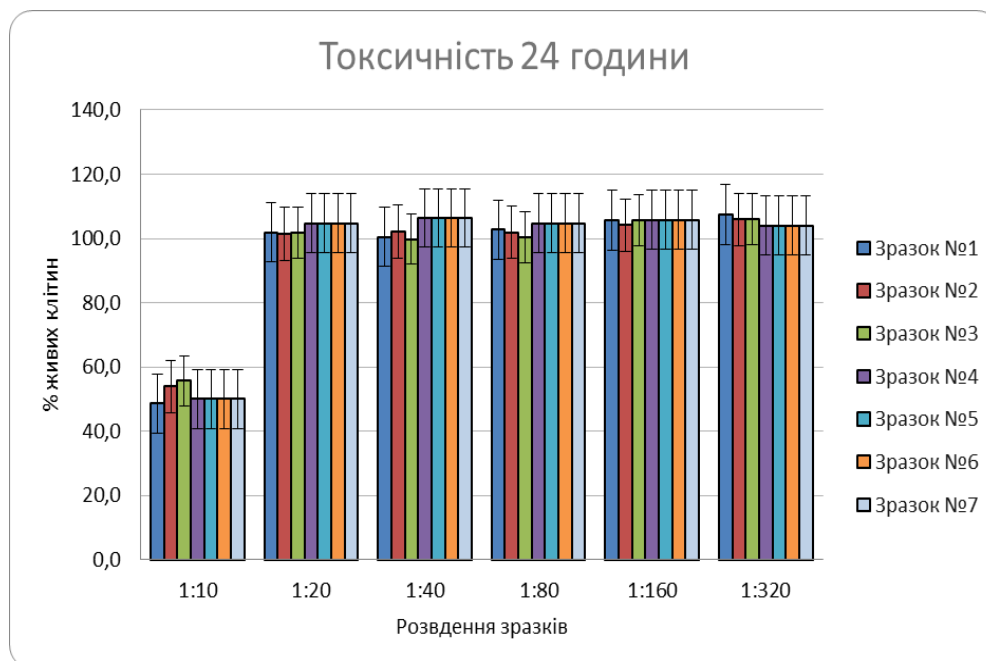


Рис.3.4. Життєздатність клітин VERO після попереднього 24 - годинного контакту з різними концентраціями метаболітів.

Продукти бактеріального метаболізму в розведенні 1:10 мають чітко виражену цитопатичну дію, що відображується на графіку: відсоток живих клітин зменшився майже вдвічі. Це свідчить про значний токсичний вплив на клітини при такій концентрації метаболітів. Зі зменшенням концентрації (1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320) спостерігається поступове зниження токсичності метаболітів та позитивний вплив на культуру клітин, що призводить до збільшення синтезу клітин. У розведеннях 1:40 та нижчих спостерігається значне покращення життєздатності клітин, що може бути пов'язано з активацією клітинних механізмів адаптації та відновлення. На графіку чітко видно тенденцію до збільшення відсотка живих клітин зі зменшенням концентрації метаболітів, що підкреслює важливість контролю концентрації

метаболітів у середовищі для підтримання оптимальних умов росту та функціонування клітин. Це також може вказувати на можливу стимулюючу дію низьких концентрацій метаболітів, які, не маючи токсичного ефекту, можуть сприяти активізації клітинного метаболізму та проліферації.

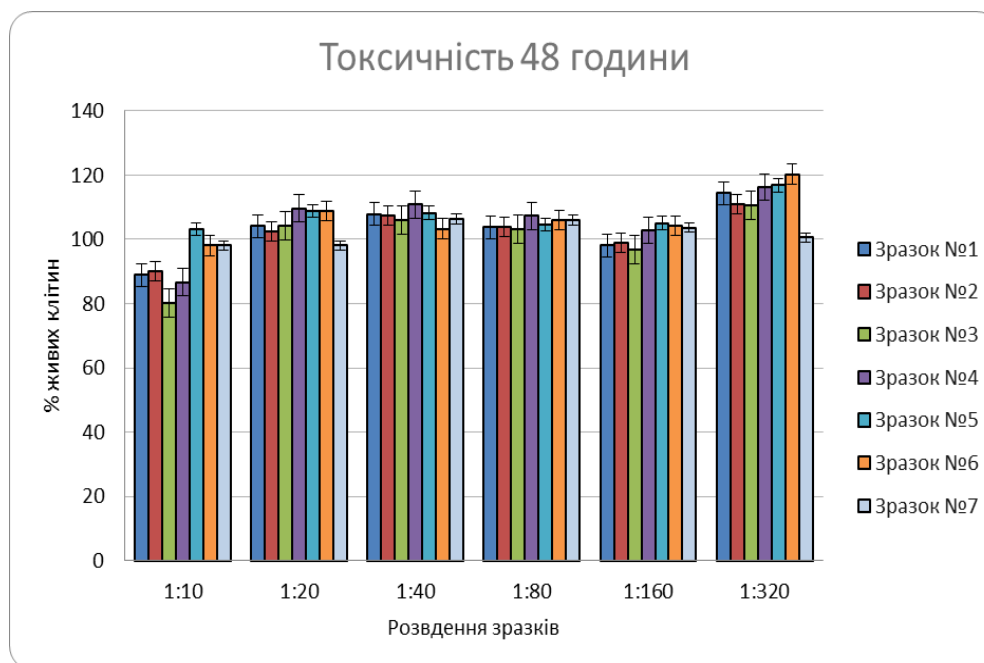


Рис.3.5. Життєздатність клітин VERO після попереднього 48 - годинного контакту з різними концентраціями метаболітів.

На цьому графіку видно, що відсоток живих клітин відносно до контролю (100%), дещо менше зменшився, на відміну від 24 годинного контакту. Це може свідчити про розвиток певних захисних механізмів в клітині під час довготривалого контакту з подразником (в нашому випадку, метаболіти).

Після дослідження цитотоксичності продуктів бактеріального метаболізму, було виявлено, що метаболіти не мають значного негативного впливу на клітини, що не завадить подальшим дослідженням.

3.3. Антивірусна активність продуктів бактеріального метаболізму

3.3.1. Вірус везикулярного стоматиту профілактична схема

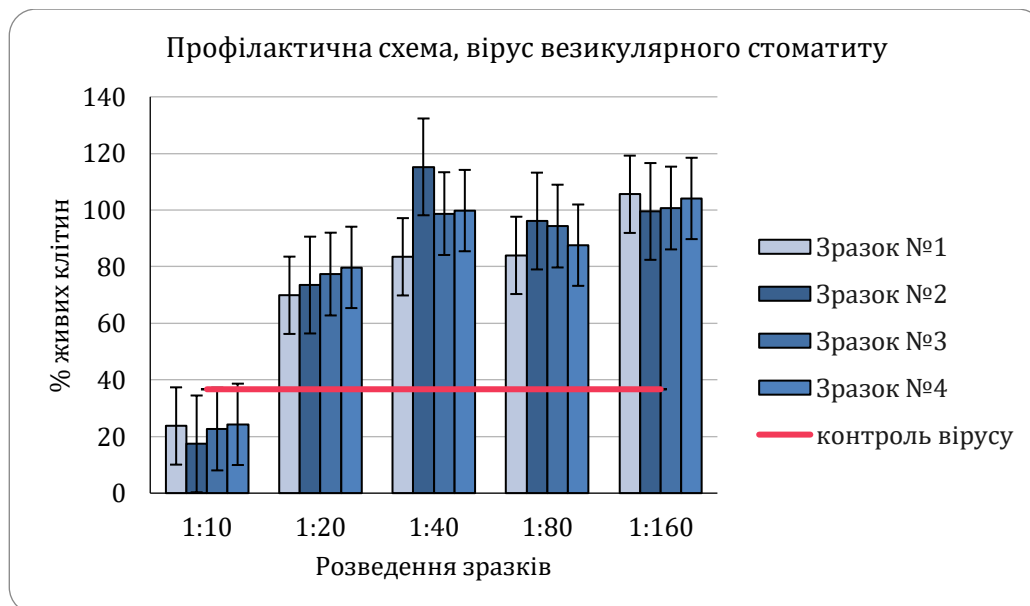


Рис.3.6. Життєздатність клітин VERO, інфікованих VSV, після попереднього 24 год контакту з різними концентраціями досліджуваних зразків.

Досліджувані продукти бактеріального метаболізму показують підвищену антивірусну активність. Варто зазначити, що при концентраціях 1:10 та 1:20 спостерігається зниження відсотку живих клітин, що може свідчити про цитопатичний ефект при високих концентраціях метаболітів з впливом вірусу на клітини. Це може вказувати на те, що високі рівні метаболітів можуть негативно впливати на клітинні мембрани або внутрішньоклітинні процеси, спричиняючи пошкодження клітин. Зі зменшенням концентрації метаболітів до 1:40, 1:80, 1:160 і 1:320 спостерігається поступове зниження токсичності, що призводить до відновлення життєздатності клітин.

3.3.2. Вірус везикулярного стоматиту терапевтична схема

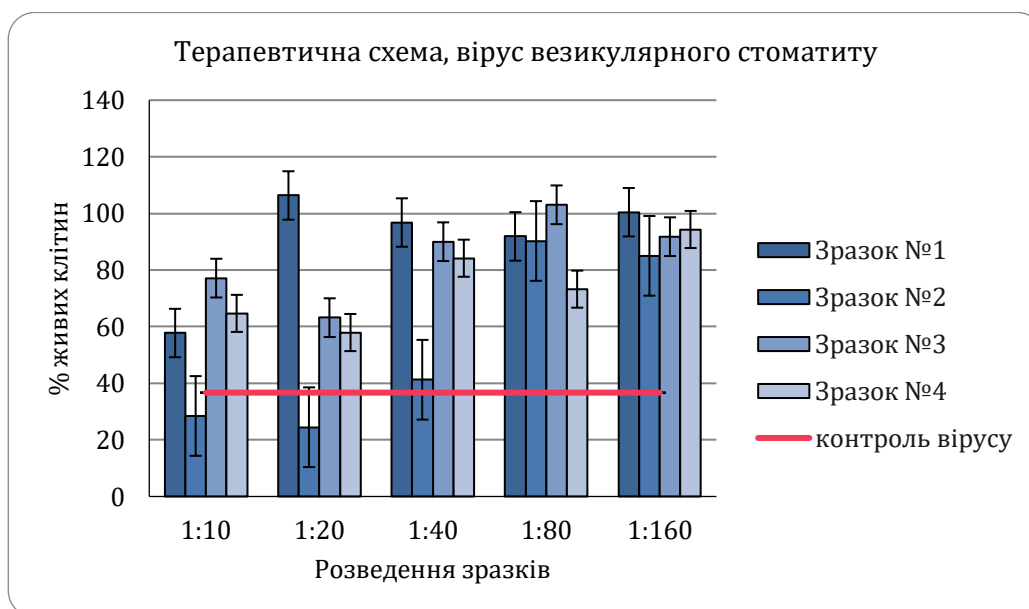


Рис.3.7. Життєздатність клітин VERO, після їхнього інфікування VSV протягом 1 год та подальшому додаванні різних концентрацій досліджуваних зразків.

Досліджувані зразки дещо підвищують антивірусну активність проти VSV. Проте в концентрації 1:10 та частково 1:20 спостерігається зниження відсотку живих клітин, що свідчить про цитопатичну дію при високих концентраціях метаболітів, особливо це спостерігається зі зразком №2. Це може бути пов'язано з пошкодженням клітинних мембран або іншими негативними впливами на клітини вірусом.

Загалом, продукти бактеріального метаболізму показують кращий терапевтичний ефект при розведеннях, починаючи з 1:40. На цих концентраціях спостерігається зниження цитопатичної дії і одночасне підвищення антивірусної активності без значного впливу на життєздатність клітин.

3.3.3. Вірус простого герпесу профілактична схема

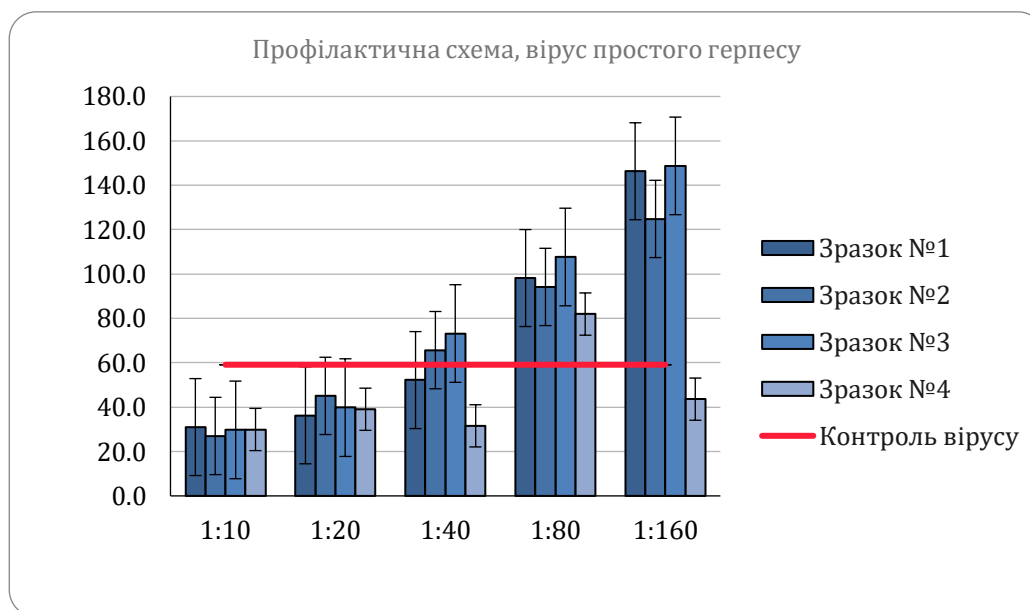


Рис.3.8. Життєздатність клітин VERO, інфікованих HSV, після попереднього 24 год контакту з різними концентраціями досліджуваних зразків.

З графіка видно, що високі концентрації метаболітів у контакті з вірусом простого герпесу мають негативний вплив на клітини. Це проявляється у зниженні відсотка живих клітин, що свідчить про виражену цитопатичну дію метаболітів при високих концентраціях. У таких умовах клітини зазнають подвійного стресу: від токсичних ефектів метаболітів і від інфекції вірусом простого герпесу. Особливо це помітно при концентраціях 1:10 та 1:20, де спостерігається значне зменшення життєздатності клітин. Це свідчить про те, що висока концентрація метаболітів може посилювати вірусну інфекцію, знижуючи здатність клітин до захисту і відновлення.

3.3.4. Вірус простого герпесу терапевтична схема

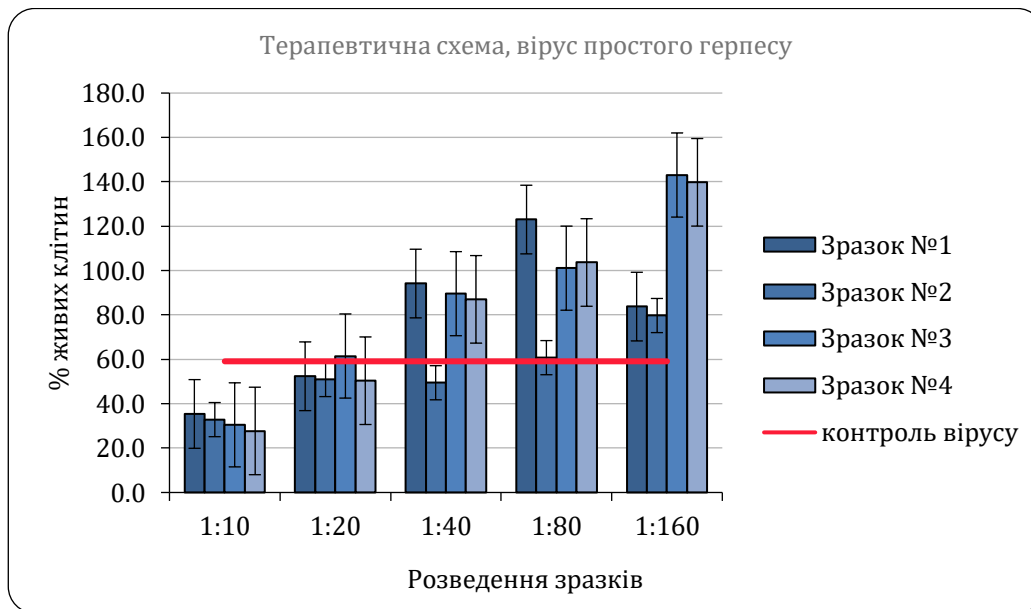


Рис.3.9. Життєздатність клітин VERO, після їхнього інфікування HSV протягом 1 год та подальшому додаванні різних концентрацій досліджуваних зразків.

На даному графіку спостерігається значне зниження відсотку живих клітин при розведенні 1:10. Це, скоріше за все, свідчить про вищезгадану цитопатичну активність метаболітів, яка проявляється при високих концентраціях. При подальшому зниженні концентрації досліджуваних продуктів, відсоток живих клітин збільшується пропорційно. Це спостерігається при розведеннях 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 і 1:320, що вказує на зменшення цитопатичної дії метаболітів. Більш низькі концентрації метаболітів виявляються менш токсичними для клітин, дозволяючи їм зберігати життєздатність і функціонувати нормально.

3.4. Обговорення результатів

На основі проведених досліджень впливу метаболітів бактеріальних клітин на антивірусну активність вдалося визначити, що ці продукти

можуть мати як позитивний, так і негативний ефекти в залежності від їх концентрації. Графіки залежності токсичності продуктів бактеріального метаболізму від концентрації метаболітів показали цікаві закономірності.

Найбільш виражена цитопатична дія спостерігалася при концентрації 1:10, що призвело до суттєвого зменшення відсотку живих клітин. Однак при подальшому зменшенні концентрації метаболітів (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320) спостерігався позитивний вплив на культуру клітин, що сигналізує про стимулюючий ефект на синтез клітин.

Досліджені продукти бактеріального метаболізму виявили підвищену антивірусну активність, але при високих концентраціях (1:10, 1:20) спостерігалася значне зниження життєздатності клітин, що може свідчити про цитопатичну дію метаболітів на клітину в умовах впливу вірусу.

Таким чином, можна зазначити, що більш низькі концентрації метаболітів (починаючи з 1:40) показують кращі результати у плані підвищення антивірусної активності без значного негативного впливу на життєздатність клітин. Високі концентрації метаболітів виявляють свою цитотоксичність, особливо взаємодіючи з вірусом простого герпесу, що може призводити до погіршення стану клітин.

ВИСНОВКИ

1. Було досліджено антивірусну профілактичну активність продуктів бактеріального метаболізму за умови внесення до культури клітин VERO за 24 год до інфікування HSV та VSV та терапевтичну антивірусну активність при внесенні досліджуваних зразків після інфікування клітин моношару HSV та VSV протягом 1 години.

2. Метаболіти бактеріального метаболізму показали здатність підвищувати антивірусну активність. Оптимальна концентрація метаболітів (1:40 та вище) сприяла підвищенню антивірусної активності без значного негативного впливу на життєздатність клітин.

3. При низьких концентраціях метаболітів спостерігався стимулюючий ефект на синтез клітин, що позитивно впливає на культуру клітин.

4. Високі концентрації метаболітів (1:10, 1:20) призводили до значного зниження життєздатності клітин через їх цитотоксичність.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дерматологія. Венерологія. Косметологія. Навчальний посібник. За редакцією А. Д. Дюдюна, С. В. Захарова, О. І. Макарчука, В. К. Захарова / С. В. Захаров, О. І. Макарчук, В. К. Захаров та ін. Дніпро, 2012. 106 с.
2. Дюдюн А. Д., Поліон Н. Н., Нагорний А. Є. Герпесвірусна інфекція. Клініко-імунологічні особливості. Дерматовенерологія. Косметологія Сексопатологія. 2015. № 3-4. С. 119-142.
3. Савустьяненко А. В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis*. На допомогу практикуючому лікарю. Актуальна інфектологія. 2016. № 2(11). С. 35-44.
4. Andrei G. Herpes simplex virus drug-resistance: new mutations and insights. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2013. Vol. 26. № 6. P. 551-560.
5. Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus* spp. and Applications in Food / Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* (Vilas A.M., ed.). Badajoz, Spain: Formatex, 2011. P. 1102-1111.
6. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics / Sumi C.D, Yang B.W., Yeo I.C., Hahm Y.T. *Can. J. Microbiol.* 2015. Vol. 61. № 2. P. 93-103.
7. Assessment of a probiotic based on *Bacillus subtilis* and its endospores in the obtainment of healthy lungs of pigs / Ayala L., Bocourt R., Milián G. et al. *Cuban Journal of Agricultural Science.* 2012. Vol. 46. № 4. P. 391-394.
8. Bernstein D. I., Bellamy A. R., Hook E. W., et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clin Infect Dis* 2013. P. 56.

9. Cernik C., Gallina K., Brodell R. T. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. *Arch Intern Med* 2008. № 168. P. 1137.
10. Effect of *Bacillus subtilis* natto on growth performance in Muscovy ducks / Sheng-Qiu T., Xiao-Ying D., Chun-Mei J. et al. /*Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2013. Vol. 15. № 3. P. 191- 197.
11. Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages / Huang Q., Xu X., Mao Y.L. et al. /*Anim. Sci. J.* 2013. Vol. 84. № 3. P. 247-252.
12. Fife K. H., Almekinder J., Ofner S. A comparison of one year of episodic or suppressive treatment of recurrent genital herpes with valacyclovir. *Sex Transm Dis* 2007. № 34. P. 297.
13. Gupta R., Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet* 2007. № 370. P. 2127.
14. Gupta R., Wald A., Krantz E., et al. Valacyclovir and acyclovir for suppression of shedding of herpes simplex virus in the genital tract. *J Infect Dis.* 2004. № 190. P. 1374.
15. Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols / Eds.: R. J. Diefenbach, C. Fraefel. N. Y. : Humana Press, Springer Science+Business Media, 2014. 331 p.
16. Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis* (natto) B4 spores on murine macrophages / Xu X., Huang Q., Mao Y. et al. *Microbiol. Immunol.* 2012. Vol. 56. № 12. P. 817-824.
17. Jeong J. S., Kim I. H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poult. Sci.* 2014. Vol. 93. № 12. P. 3097-3103.
18. Jin F., Prestage G. P., Mao L. et al. Transmission of herpes simplex virus types 1 and 2 in a prospective cohort of HIV-negative gay men: the health in men study. *J Infect Dis.* 2006. № 194. P. 561.

19. Johnston C., Magaret A., Selke S., et al. Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. *J Infect Dis* 2008. № 198. P. 31.
20. Lebrun-Vignes B., Bouzamondo A., Dupuy A., et al. A meta-analysis to assess the efficacy of oral antiviral treatment to prevent genital herpes outbreaks. *J Am Acad Dermatol* 2007. № 57. P. 238.
21. Leser T. D., Knarreborg A., Worm J. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 104. № 4. P. 1025-1033.
22. Modulatory Effects of *Bacillus subtilis* BS02 on Viability and Immune Responses of RAW 264.7 Murine Macrophages / Huang Q., Li Y.L., Xu X. et al. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012. Vol. 11. № 11. P. 1934-1938.
23. *Molecular Virology* / S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, H. Schätzl. B. etc.: Springer, 2013. 1013 p.
24. Nicoll M. P. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012. Vol. 36. № 3. P. 684-705.
25. Olmos J., Paniagua-Michel J. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *J. Microb. Biochem. Technol.* 2014. Vol. 6. № 7. P. 361-365.
26. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/ feed additives. *EFSA Journal*. 2005. Vol. 3. № 6. DOI: 10.2903/j.efsa.2005.226.
27. Perre P. Van de. Herpes simplex virus: a new era? *Lancet*. 2012. Vol. 18. № 379 (9816). P. 598-599.
28. Prevention, recognition and management of neonatal HSV infections / J. L. Robinson, W. L. Vaudry, S. E. Forgie, B. E. Lee. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012. Vol. 10. № 6. P. 675-685.

29. Principles of Virology (2-Volume Set), 4th Edn. / S. J. Flint, L. W. Enquist, V. R. Racaniello et al. American Society for Microbiology, 2015. 1060 p.
30. Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel / Awais M., Pervez A., Yaqub Asim, Shah M.M. // Pakistan J. Zool. 2010. Vol. 42. № 3. P. 267-275.
31. Sebastian A. P., Keerthi T. R. Immunomodulatory effect of probiotic strain *Bacillus subtilis* MBTU PBBMI spores in Balb/C Mice. International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR). 2014. Vol. 2. № 11. P. 258-260.
32. Sorokulova I. Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. J. Prob. Health. 2013. Vol. 1. № 4.
33. Structure and reactivity of *Bacillus subtilis* MenD catalyzing the first committed step in menaquinone biosynthesis / Dawson A., Chen M., Fyfe P.K. et al. J. Mol. Biol. 2010. Vol. 401. № 2. P. 253-264.
34. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter / Fujiya M., Musch M.W., Nakagawa Y. et al. Cell Host Microbe. 2007. Vol. 1. № 4. P. 299-308.
35. The Intestinal Life Cycle of *Bacillus subtilis* and Close Relatives / Tam N.K.M., Uyen N.Q., Hong H.A. et al. Journal of Bacteriology. 2006. Vol. 188. № 7. P. 2692-2700.
36. Wagoner N. J. Van. Herpes diagnostic tests and their use / N. J. Van Wagoner, E. W. Hook 3rd. Curr. Infect. Dis. Rep. 2012. Vol. 14. № 2. P. 175-184.
37. Wald A., Selke S., Warren T. et al. Comparative efficacy of famciclovir and valacyclovir for suppression of recurrent genital herpes and viral shedding. Sex Transm Dis 2006. № 33. P. 529.

38. Wang G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. Pharmaceuticals. 2014. Vol. 7. № 5. P. 545-594.
39. Workowski K. A., Bolan G. A. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep. 2015. № 64. P. 1.
40. Yang J. J., Niu C. C., Guo X. H. Mixed culture models for predicting intestinal microbial interactions between *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in the presence of probiotic *Bacillus subtilis*. Benef. Microbes. 2015. Vol. 6. № 6. P. 871- 877.
41. Zhang Y. R., Xiong H. R., Guo X. H. Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis*. Folia Microbiol. (Praha). 2014. Vol. 59. № 1. P. 31-36.
42. World Health Organization. Herpes Simplex Virus. [online] Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus> (Accessed on June 01, 2021).
43. Whitley R, Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. [online] Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30443341/> [Accessed 31 Oct. 2018].
44. Varatharaj A, Nicoll JA, Pelosi E, Pinto AA. Corticosteroid-responsive focal granulomatous herpes simplex type-1 encephalitis in adults. Pract Neurol 2017; 17:140
45. Shuyong Zhu , Abel Viejo-Borbolla (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. [online] Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34676800/>
46. Lin Xu, Xuan-Lei Zhong, Zhi-Chao Xi, Yang Li and Hong-Xi Xu (2022).

Medicinal plants and natural compounds against acyclovir-resistant HSV infections, [online] Volume 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1025605> [Accessed 10 Oct. 2022].

47. Manuel Cotarelo, Pilar Catalán, Carlos Sánchez-Carrillo, Ana Menasalvas, Emilia Cercenado, Antonio Tenorio, Emilio Bouza, Cytopathic effect inhibition assay for determining the in-vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 44, Issue 5, November 1999, Pages 705–708, <https://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>

48. Huang P, Wang X, Lei M, Ma Y, Chen H, Sun J, Hu Y, Shi J. Metabolomics Profiles Reveal New Insights of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(2):1521. <https://doi.org/10.3390/ijms24021521>

49. World Health Organization. “Herpes Simplex Virus.” *Who.int*, World Health Organization: WHO, 10 Mar. 2022, www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus

50. Li F, Wang Y, Song X, Wang Z, Jia J, Qing S, Huang L, Wang Y, Wang S, Ren Z, Zheng K, Wang Y. The intestinal microbial metabolite nicotinamide n-oxide prevents herpes simplex encephalitis via activating mitophagy in microglia. *Gut Microbes*. 2022 Jan-Dec;14(1):2096989. doi: 10.1080/19490976.2022.2096989

51. Lichty BD, Power AT, Stojdl DF, Bell JC. *Trends Mol Med* May;2004 10:210. [PubMed: 15121047]

52. Stojdl DF, et al. *Cancer Cell* Oct;2003 4:263. [PubMed: 14585354]

53. Irie, Takashi & Liu, Yuliang & Drolet, Barbara & Carnero, Elena & García-Sastre, Adolfo & Harty, Ronald. (2012). Cytopathogenesis of Vesicular Stomatitis Virus Is Regulated by the PSAP Motif of M Protein in a Species-Dependent Manner. *Viruses*. 4. 1605-18. 10.3390/v4091605.