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

Ісаєнко Олена Юріївна

УДК: 615.015.8: 615.33: 615.372:[615.331+615.339]

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ НОВОЇ СТРАТЕГІЇ РОЗРОБКИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ НАТИВНИХ МЕТАБОЛІТНИХ КОМПЛЕКСІВ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG І *SACCHAROMYCES BOULARDII* ДЛЯ ПОДОЛАННЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНИХ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІЙНИХ ІНФЕКЦІЙ

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній установі «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України».

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор **Бабич Євгеній Михайлович,** Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», завідувач лабораторії профілактики краплинних інфекцій;

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Філімонова Наталія Ігорівна**, Національний фармацевтичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології;

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

доктор медичних наук, професор **Кременчуцький Геннадій Миколайович,** Дніпровський державний медичний університет МОЗ України, професор кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології.

Захист дисертації відбудеться « 6 » травня 2021 р. об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 при Державній установі «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська 14-16.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська 14-16.

Автореферат розісланий « 5 » квітня 2021 року.

В.о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01,
д. мед. н. А. Ю. Волянський

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сучасною світовою проблемою є постійне збільшення кількості бактерій з множинною і розширеною лікарською резистентністю (Feretzakis G. et. al., 2019; Barragan-Prada H. et. al., 2019; WHO. Strengthening implementation of antimicrobial resistance national action plans. Geneva, 2020; Anderson M., Mossialos E., 2020). Кабінет Міністрів України 6 березня 2019 року затвердив «Національний План дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів». Інфекційні хвороби, викликані антибіотикорезистентними збудниками, щорічно призводять до 700 000 смертельних випадків, а до 2050 року (при збереженні подібної тенденції) припускають 10 мільйонів смертей, що перебільшить нинішній показник у 14,3 раза (Nicolaou K. et al., 2018). В Європі щороку внаслідок нозокоміальних інфекцій, спричинених резистентними штамами, помирає 25 000 осіб (WHO. European Observatory on Health Systems and Policies. Eurohealth, 2020; Дмитрик К., 2020). Складнощі лікування таких інфекцій обумовлені недостатньою ефективністю антибактеріальних препаратів (Vezir E. et al. 2016; Moral L., Caubet J. C., 2017; Kimberly G. Blumenthal et al., 2019; Krusenstjerna-Hafstrøm T., 2020).

Впровадження нових протимікробних препаратів досі не вирішило зазначену всесвітню проблему антибіотикорезистентності (Arcilla M. S., 2017; Tsutsui A. et al., 2018). Загальновизнано неможливість створення антибіотиків, до яких не буде звикання та розвитку стійкості у мікроорганізмів (WHO. Antimicrobial resistance. Geneva, 2020). Це пов'язано з наявністю резистентності у бактерій до майбутніх препаратів природного й полусинтетичного походження, що встановлено при дослідженні архівних ізолятів (Santiago-Rodriguez T. M. et al., 2017, Popov M. M. et al., 2018).

Для переважної кількості умовно-патогенних збудників інфекційних хвороб відома здатність до утворення біоплівок (Chen H. et al., 2018; Dostert M. et al., 2019; Angela Di Somma et al., 2020; Wu B. C. et al., 2021). За різними даними, для боротьби з мікроорганізмами у стані біоплівки, концентрацію антибактеріальних препаратів необхідно підвищувати в 10 – 5000 разів відносно планктонних клітин (Мелешкин Н. С., 2017; Полыгач О. А. и др., 2018). Додаткові труднощі обумовлені складним мікробіоценозом біоплівкових інфекцій, до складу яких входять десятки видів мікроорганізмів, у т.ч. резистентних до антибіотиків (Lluch E. J. et al., 2020).

На тлі низької ефективності антибактеріальних препаратів відносно резистентних і бактерій у стані біоплівок, альтернативою визнано метаболітні пробіотики (метабіотики) (Oliveira L. C. et al., 2017; Shen X. et al., 2018; Fuochi V. et al., 2019; Giovanni Di Bonaventura et al., 2019; Jie Gao et al., 2019). На відміну від антибіотиків, вони мають низьку швидкість індукування бактеріальної стійкості, підвищують загальну резистентність макроорганізму, впливають на функції імунокомпетентних клітин, стимулюють ріст представників нормофлори, діють в широкому діапазоні значень pH, термостабільні (Frickmann H. et al, 2018; Perez R. H. et al., 2018; Xin B. et al., 2020). Метаболіти пробіотичних мікроорганізмів, за сучасними методами

отримання, переважно, володіють низьким рівнем протимікробної активності, вузьким спектром дії та потребують модифікації (Al-Malkey M. K. et al., 2017; Osama D. M. et al., 2017; Mančušková T., Medveďová A., Valík Ľ. 2017; Chen H. et al., 2018).

В останні десятиріччя арсенал закордонної практичної медицини поповнено препаратами метаболітного типу «Nisaplin» (виробник «Aplin & Barrett Ltd», Англія), «Valisin ®» (виробник «Mayasan A.S.»,Турція), «Krisin» (виробник «Christian Напсеп», Данія), діючою речовиною яких є нізин, отриманий із пробіотичного штаму *Lactococcus lactis*, та «Томіцід» (Біомед ім. І.І. Мечникова, Росія), продукт метаболізму непатогенного стрептокока. Однак, зазначені препарати виявляють активність тільки проти грампозитивних бактерій. Світова фармацевтична промисловість має обмеженість щодо лікувально-профілактичних препаратів метаболітного типу та відсутність нативних немодифікованих високоактивних речовин з багатоспрямованою дією, зокрема проти грамнегативних антибіотикорезистентних мікроорганізмів, особливо в біоплівкових формах, тому актуальним є отримання метаболітів із застосуванням, як факторів росту, ультразвукових дезінтегратів пробіотиків. Робота присвячена визначенню шляхів використання метаболітних комплексів з поліфункціональними властивостями щодо профілактики і лікування інфекційних хвороб, спричинених антибіотикорезистентними збудниками.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження за темою дисертації проводилися в рамках виконання 2 науково-дослідних робіт лабораторії профілактики краплинних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (ДУ ІМІ НАМН) впродовж 2016-2021 рр.: «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (№ держреєстрації 0116U000864) та «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідо- пробіотиків» (№ держреєстрації 0119U100686). Дисертант була відповідальним виконавцем обох тем, розроблювала способи одержання нативних речовин і оптимальні схеми їх застосування, аналізувала та узагальнювала дані експериментальних досліджень.

Мета і завдання дослідження. ***Мета*** – обґрунтувати нову стратегію розробки та застосування нативних метаболітних комплексів на основі ультразвукових дезінтегратів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 для подолання важких запальних процесів, обумовлених антибіотикорезистентними бактеріями в планктонній і біоплівковій формах.

Завдання дослідження:

1. Розробити новий спосіб отримання нативних продуктів життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів, їхніх комбінацій, відібрати найбільш активні за протимікробними властивостями речовини й обґрунтувати перспективність створення метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC

53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 при застосуванні, як факторів росту, власних ультразвукових дезінтегратів.

2. Визначити біохімічний склад і безпечність у токсикологічних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* ультразвукових дезінтегратів та отриманих у них метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745.

3. Дослідити вплив речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 на гемолітичну, лецитовітелазну активності, продукування пігментів (піоціанін, піовердин, піорубін) умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів.

4. Охарактеризувати антибактеріальні властивості фільтратів ультразвукових дезінтегратів і метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 відносно референтних, патогенних, умовно-патогенних бактерій, включаючи антибіотикорезистентні ізоляти.

5. Вивчити вплив метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 на адгезію бактеріальних клітин еталонного штаму *S. aurues* ATCC 6538 P (209-P) при його обробці дослідними речовинами або еритроцитів людини метаболітами; біоплівкоутворення й попередньо сформовані 24-годинні біоплівки окремими представниками референтних, патогенних, антибіотикорезистених умовно-патогенних мікроорганізмів.

6. Розробити оригінальний спосіб отримання нативних метаболітів завдяки вирощуванню продуцентів (*S. boulardii* CNCM I-745) в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотиків (зокрема *L. rhamnosus* GG ATCC 53103) для підвищення протимікробних, антиадгезивних, протибіоплівкових властивостей.

7. Порівняти мінімальні інгібуючі та бактерицидні концентрації метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 відносно планктонних і біоплівкових форм бактерій.

8. Вивчити *in vitro* комбіновану активність речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами відносно патогенних *Corynebacterium* spp. та антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій при одночасному та послідовному їхньому застосуванні.

9. В експериментах *in vivo* дослідити протимікробні властивості при окремому лікувальному і профілактично-лікувальному застосуванні метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 щодо ран, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa* PR № 0924.

10. На моделях ран лабораторних тварин, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa* PR № 35, оцінити ефективність комбінованого застосування біологічно активних речовин лактобактерій і сахароміцетів з амікацином.

Об'єкт дослідження: пробіотичні штами мікроорганізмів, референтні, патогенні та умовно-патогенні бактерії, включаючи мультирезистентні до антибактеріальних препаратів ізоляти, клітинні структури, метаболітні комплекси, комбінація метаболітного комплексу сахароміцетів і лактобактерій.

Предмет дослідження: протимікробні, антиадгезивні, протибіоплівкові, токсичні властивості біологічно активних речовин пробіотичних штамів мікроорганізмів, біохімічний склад, чутливість до антибіотиків, комбінована протимікробна дія з антибіотиками, морфологічні, тинкторіальні, культуральні характеристики, фактори патогенності.

Методи дослідження: бактеріологічні (культивування пробіотичних штамів *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum, E. faecium, S. boulardii,* патогенних та умовно-патогенних бактерій, підрахунок кількості життєздатних клітин зазначених мікроорганізмів (КУО/мл), визначення чутливості бактерій до антибактеріальних препаратів різних груп, вивчення протимікробних властивостей антибактеріальних препаратів окремо та у комбінації з нативними біологічно активними речовинами), мікроскопічні, фізичні та фізико-хімічні (ультразвукова дезінтеграція мікроорганізмів, спектрофотометричний метод дослідження впливу речовин на планктонні та біоплівкові форми патогенних і умовно-патогенних бактерій, високоефективна рідинна гель-проникаюча хроматографія, рідинна гель-хроматографія), біохімічні (склад клітинних структур і метаболітних комплексів), біологічні (дослідження протимікробних властивостей окремо метаболітних комплексів та у поєднанні з антибактеріальними препаратами на моделі інфікованих ран у мурчаків), токсикологічні (при топічному нанесенні, внутрішньошлунковому і внутрішньоочеревинному введенні мишам, у кон'юнктивальній пробі на мурчаках), аналітичні та медико-статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше обґрунтовано перспективність розробки та методи оптимального застосування нативних метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (як основна діюча речовина) та в комбінації з антибіотиками (як додатковий препарат) з метою створення засобів подолання важких запальних процесів, обумовлених антибіотикорезистентними бактеріями в планктонній і біоплівковій формах.

Вперше запропоновано на основі ультразвукових дезінтегратів пробіотичних мікроорганізмів отримання нативних високоактивних речовин *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 та *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 проти планктонних і біоплівкових форм патогенних та антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій, які в низьких концентраціях (від ≤ 0,02 мг / мл) мають бактерицидний ефект відносно обох форм збудників бактерійних інфекцій.

Вперше показана можливість застосовувати ультразвукові дезінтеграти для культивування не лише власних, а й інших продуцентів пробіотичних мікроорганізмів, зокрема грибів і бактерій. Обґрунтовано доцільність і адаптовано технічні етапи одержання комбінації метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 для посилення протимікробної дії кінцевого продукту проти патогенних бактерій, в 2,4 раза, внаслідок спільного вирощування пробіотичних сахароміцетів і лактобактерій в ультразвукових дезінтегратах пробіотиків. Одержано нові дані щодо пригнічення гемолітичної, лецитовітелазної активностей, накопичення

пігментів (піоціаніну, піовердину, піорубіну) патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів біологічно активними речовинами *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745.

Показано, що протимікробний комплекс *S. boulardii* CNCM I-745 і *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, який містить клітинні структури лактобактерій і метаболіти сахароміцетів, має більш виражені антиадгезивні (*S. aurues* ATCC 6538 P) й протибіоплівкові (*C. diphtheriae gravis* tox + № 108, *C. ulcerans* tox+ № 112, *P. aeruginosa* ATCC 27853) властивості.

Вперше доведено здатність метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745, отриманих за авторськими способами, підвищувати чутливість патогенних і антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій до антибактеріальних препаратів *in vitro*.

Вперше запропоновано застосування послідовного використання нативних метаболітних комплексів і комбінацій *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами *in vitro*. Експериментально доведено перевагу зазначеного способу порівняно з окремим випробуванням антибіотику або комбінованим одночасним їхнім впливом.

Підтверджено в експериментах *in vivo* на моделі ран мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним збудником *P. aeruginosa* PR № 0924, протимікробну активність метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, отриманого культивуванням продуцентів в ультразвукових дезінтеграторах пробіотиків.

Одержано нові дані *in vivo* на моделі ран шкіри мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 35, щодо ефективності одночасного та послідовного застосування комбінації *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з амікацином, яке сприяє швидшій ерадикації збудника, що в подальшому може бути включено в програму лікування гнійно-запальних хвороб.

Практичне значення одержаних результатів. На основі ультразвукових дезінтеграторів пробіотичних мікроорганізмів *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 і *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 отримано метаболітні комплекси з вираженими поліфункціональними властивостями, які стали підґрунтям нової стратегії розробки нативних речовин. Запропоновані методи захищено патентами України на корисну модель: «Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій» (патент України № 123122), «Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій» (патент України № 126603). Розроблено і впроваджено у медичну практику галузеві нововведення: «Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій», «Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій». Обґрунтовані способи запропоновано для впровадження на виробничі підприємства, для розробки на їх основі ряду антимікробних засобів, комплексне використання яких, спільно зі стандартними схемами терапії, значно покращить результативність лікування пацієнтів з інфекційними хворобами, спричиненими антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

Отримані метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745, які не потребують додаткової очистки і модифікації, рекомендовано для доклінічних випробувань і подальшого введення в практичну медицину для запобігання розвитку нозокоміальних і хронічних інфекційних процесів у людини.

Запропонована нова стратегія оптимального послідовного використання метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибіотиками для терапії інфекційних хвороб різного ґенезу та етіології, у тому числі викликаних антибіотикорезистентними бактеріями.

Основні матеріали й положення дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес і наукову роботу кафедри молекулярної та медичної біофізики ХНУ ім. В. О. Каразіна (3 акта впровадження від 27.12.2017 р., 22.01.2019 р. та 20.01.2020 р), кафедри технології переробки, стандартизації та технічного сервісу Харківської державної зооветеринарної академії (3 акта впровадження від 21.01.2020 р., 17.03.2020 р. та 08. 09.2020 р.), кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету (акт впровадження від 29.05.20 р.), кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «Харківський політехнічний інститут» (акт впровадження від 10.12.20 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Особисто дисертантом на основі проведеного інформаційно-патентного пошуку, проаналізованої літератури щодо інфекційних хвороб, спричинених антибіотикорезистентними, біоплівкоутворюючими мікроорганізмами, враховуючи необхідність підвищення ефективності антимікробної терапії та забезпечення практичної медицини ефективними й доступними протимікробними засобами, визначено мету дослідження, завдання для її досягнення та шляхи її реалізації, методологію досліджень. Узагальнено сучасні дані наукової літератури за цим напрямом, проведено експериментальну роботу за темою дисертації з використанням бактеріологічних, мікроскопічних, фізичних, фізико-хімічних, біохімічних, біологічних, токсикологічних, аналітичних і медико-статистичних методів досліджень, а також проведено науковий аналіз отриманих результатів. Усі наукові узагальнення, положення, висновки та рекомендації, що викладено в дисертації, отримано автором самостійно. Наукові положення і результати, які виносилися на захист у кандидатській дисертації, не виносяться на захист здобувачем наукового ступеня доктора медичних наук у його докторській дисертації.

Особистий внесок автора в опублікованих зі співавторами працях наводиться в тексті дисертації та в авторефераті у списку публікацій за темою дисертації.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації було оприлюднено на науково-практичній конференції «Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення» (м. Харків, 22 травня 2020 р.); дистанційній науково-практичній конференції «Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині» (м. Харків, 19 березня

2020 р.); IV міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 12-13 березня 2020 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів» (м. Харків, 16-17 травня 2019 р); І міжнародній науково-практичній конференції «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації», (м. Харків, 15 травня 2019 р.); І науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (м. Харків, 18 жовтня 2018); Всеросійській науково-практичній конференції «Экстренная и неотложная медицинская помощь – XXI век» (м. Барнаул, 2017); науково-практичній конференції з медичної мікології (XX Кашкінські читання) (м. Санкт-Петербург, 14-16 червня 2017 р.); І міжнародній науково-практичній конференції "Ліки - людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів" (м. Харків, 30-31 березня 2017 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 35 наукових праць (6 – одноосібно), серед них 2 зарубіжні колективні монографії, 20 статей у наукових фахових виданнях (2 – у міжнародній наукометричній базі Scopus (Q3), 9 – у міжнародній наукометричній базі Web of Science, 9 включено до інших міжнародних наукометричних баз), 2 патенти України на корисну модель, 2 галузевих нововведення у сфері охорони здоров’я, 9 тез у збірниках міжнародних конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 379 сторінках друкованого тексту, містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, дев'ять розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, практичні рекомендації та список використаних першоджерел (481 посилання). Дисертаційна робота містить 43 таблиці, 48 рисунків, 5 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді літератури представлено світові дані щодо проблем стрімкого набуття та розповсюдження антибіотикорезистентності у бактерій і біоплівкових форм збудників бактерійних хвороб. Теоретично обґрунтовано необхідність підвищення ефективності антимікробної терапії інфекційних хвороб, спричинених зазначеними бактеріями. Висвітлено перспективність розробки протимікробних препаратів на основі похідних і метаболітів пробіотичних штамів мікроорганізмів, серед останніх надано перевагу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*. Показано відомі методи отримання продуцентів і метаболітів пробіотиків та теоретично обґрунтовано їх недоліки. Проаналізовано сучасні дані окремого й спільного з антибактеріальними препаратами застосування метаболітів пробіотичних штамів мікроорганізмів. Наведено узагальнюючі аргументи щодо необхідності створення нових препаратів метаболітного типу та визначення більш ефективних шляхів їхнього використання в антимікробній терапії сучасних інфекційних хвороб.

Матеріали та методи досліджень. У роботі продуцентами метаболітів були 4 пробіотичних штама мікроорганізмів: *Lactobacillus rhamnosus* LGG ATCC 53103 (*L. rhamnosu* GG ATCC 53103) з симбіотика PREEMA® (Schonen, Швейцарія), *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (*S. boulardii* CNCM I-745) з пробіотичного засобу BULARDI® (Schonen, Швейцарія), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) з Лінекс® (Lek Pharmaceuticals d. d., Словенія), *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) з Лактобактерин (Біофарма, Україна).

Тест-штамами для вивчення протимікробних властивостей дослідних речовин були: референтні штами *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aurues* ATCC 6538 (209-P); патогенні мікроорганізми *Corynebacterium* tox + spp. (n = 16)*;* антибіотикорезистентні (PR) клінічні ізоляти *Corynebacteria non diphtheriae* spp. (n = 19), *Staphylococcus* spp. (n = 9), *Enterococcus* spp. (n = 4), *Streptococcus* spp. (n = 2), *Proteus* spp. (n = 2), *K. pneumoniae* (n = 3), *P. aeruginosa* (n = 9), *E. coli* (n = 2), *A. baumannii* PR (n = 2), *L. amnigena* PR № 284, *E. cloacae* № 269, *N. mucosa* № 69, отримані з колекції Музею Мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» та лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН».

Експериментальні дослідження проводили на двох групах об’єктів: мікробних / клітинних структурах (КС) і структурно-метаболітних комплексах (МК), що являють собою біологічно активні речовини (БАР) пробіотичних штамів мікроорганізмів.

Культури *L. rhamnosus* GG або *L. plantarum* вирощували на середовищі Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Росія), *S. boulardii* – Сабуро агар з глюкозою (ТОВ «Фармактив», Україна), *E. faecium* – Ентерокок агарі (ТОВ «Фармактив», Україна) за мікроаерофільних та аеробних умов відповідно, при температурі (37 ± 1) ºС впродовж 20 – 24 годин. Робочі суспензії культур готували відповідно до стандарту каламутності, за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-La-Meter (виробництво PLIVA-Lachema, Чеська Республіка, свідоцтво держповірки № 84504/5 від 16.12.2019 р), оптичні густини яких доводили до 10,0 одиниць за шкалою McFarland (од. McFarland) (що відповідало ~ 10^9 колонієутворюючих одиниць (КУО/мл) мікроорганізмів згідно з інструкцією до приладу).

Дезінтеграцію клітин пробіотичних штамів проводили шляхом обробки мікробних суспензій *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum*, *E. faecium* або *S. boulardii* низькочастотними ультразвуковими хвилями, з використанням генератора Г3 - 109, навантаженого на кільцеві п’єзокерамічні перетворювачі типу ЦТС («Великолукський Радіозавод»), при частоті fmax = 40,0 кГц, середньої потужності 0,25 – 0,5 Вт впродовж 6 годин. Ступінь їх руйнування контролювали за зменшеннями оптичної густини мікробної суспензії за даними приладу Densi-La-Meter (після дезінтеграції порівняно з початковими показниками до опромінення) і кількості колонієутворюючих одиниць (метод послідовних десятикратних розведень), результати виражали (lg КУО/мл).

Після ультразвукового опромінення зразки дезінтегратів мікробних клітин *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum*, *E. faecium* або *S. boulardii* концентрували випарюванням (30 – 60 хвилин), прогрівали (температура (80 ± 1)° С, 40 –

50 хвилин) і застосовували для вирощування культур пробіотичних штамів мікроорганізмів, замість традиційних живильних середовищ. Дослідні зразки фільтратів, що містять клітинні структури – *L. rhamnosus* GG (L), *L. plantarum* (L_p), *E. faecium* (E) або *S. boulardii* (S), отримували центрифугуванням таких самих ультразвукових дезінтегратів (1000 g, 30 хвилин або 1100 g, 15 хвилин) і фільтруванням супернатанту (мембранні фільтри «Владіпор» МФАС-Б № 4, діаметр пор 0,2 мкм, «Владіпор», РФ).

Метаболітні комплекси L. rhamnosus GG (ML), *L. plantarum* (ML_p) та *S. boulardii* (MS) одержували із середовищ культивування мікроорганізмів продуцентів (оптична густина 1,0 або 10,0 од. McFarland) в ультразвукових дезінтегратах власних пробіотиків (посівний матеріал складав 10 % від загального об'єму) або в поживному бульйоні (МПБ, Biolife, Італія) з додаванням 1 % глюкози для отримання метаболітів *L. rhamnosus* (ML (Б)) та *S. boulardii* (MS (Б)) за традиційним способом. Культивували в мікроаерофільних (лактобактерії) та аеробних (сахароміцети) умовах впродовж трьох діб, при температурі (37 ± 1)ºС, центрифугували (1000 g, 30 хвилин / 1100 g, 15 хвилин), фільтрували (мембранні фільтри «Владіпор», діаметр пор 0,2 мкм).

Отримання оригінального метаболітного комплексу S. boulardii (LS) відрізнялося додаванням суспензії сахароміцетів до клітинних структур *L. rhamnosus* GG. Аналогічним чином одержували інші метаболітні комплекси: *L. plantarum* (L_rL_p) та *L. plantarum* (EL_p) – мікроаерофільні умови вирощування лактобактерій в ультразвукових дезінтегратах *L. rhamnosus* GG або *E. faecium* відповідно*; E. faecium* (L_rE) та *E. faecium* (L_pE) – аеробні умови культивування ентерококів в ультразвукових дезінтегратах *L. rhamnosus* GG або *L. plantarum* відповідно.

Комбінацію метаболітного комплексу L. rhamnosus GG *та S. boulardii* (MLS) й (MLS (Б)) отримували внесенням суміші мікробних клітин лактобактерій і сахароміцетів (1:1), з оптичною густиною 1,0 або 10,0 од. McFarland (10 % від загального об'єму), до ультразвукових дезінтегратів *L. rhamnosus* GG або поживного бульйону з додавання 1 % глюкози, далі відповідно вищезазначеному способу.

Ступінь наростання біомаси мікробних клітин пробіотичних штамів мікроорганізмів контролювали за кількістю КУО (lg КУО/мл) та рівнем pH (pH-метр pH-410 у комплекті з електродами, "НПКФ АКВИЛОН", РФ) одразу після внесення мікробних клітин в ультразвуковий дезінтеграт і після культивування протягом 3 діб.

Пілотні дослідження антибактеріальних властивостей метаболітних комплексів L. rhamnosus GG, L. plantarum, E. faecium або S. boulardii якісним методом передбачали внесення суспензії тест-штамів (1,0 од. McFarland) у БАР у співвідношенні 1:9 (дослідні проби). Позитивний контроль (ПК) – відповідна культура та поживний бульйон з додаванням 1 % глюкози, негативний контроль (НК) – відповідна культура та 0,9 % розчин натрію хлориду. Зразки інкубували за температури (37 ± 1) °С протягом 1, 2, 24 та 48 годин з наступним висівом на агар Мюллера – Хінтона (ТОВ «Фармактив», Україна). Відсутність

росту бактерій в дослідних пробах свідчило про протимікробну активність фільтрату.

Аналогічно вивчали вплив БАР (дослід) на гемолітичну активність (поживний агар (Biolife, Італія) з додаванням 5 % крові), лецитовітелазну активність (жовтково-сольовий агар), накопичення пігментів (середовище Мюллера-Хінтона) окремих представників *Staphylococcus, Pseudomonas, Corynebacterium* (1,0 / 5,0 / 10,0 од. McFarland).

Вивчення антибактеріальних властивостей метаболітних комплексів L. rhamnosus GG *та S. boulardii за кількісним методом* Дослідні зразки містили завісь культури збудника і БАР у співвідношенні 1:9, контрольні – тест-штами бактерій і 0,9 % розчин натрію хлориду. Робочі суспензії збудників готували з оптичною густиною 0,5 од. McFarland та розводили в 10 разів (0,05 ум. од. McFarland) – перша концентрація (Наказ МОЗ України № 167, 2007) та 1,0 од. McFarland – друга концентрація. Результати життєздатних колоній виражали в lg КУО/мл.

Вивчення антибактеріальних властивостей БАР за спектрофотометричним методом передбачало застосування поживного бульйону з додаванням 1% глюкози. Кількість бактерій відповідала 10^6 КУО/мл, концентрація метаболітних комплексів – (~ 20 % від загального об'єму). ПК – тест-штами бактерій з поживним бульйоном із додаванням 1 % глюкози та 0,9 % розчином натрію хлориду, НК – поживний бульйон із додаванням 1% глюкози та 0,9 % розчином натрію хлориду. Пригнічення росту і розмноження культур бактерій виражалося у відсотку інгібування приросту (ІП) тест-штамів.

Біохімічний аналіз одержаних БАР пробіотичних штамів мікроорганізмів проводили за класичними методами: білок методом Lowry O. H. (Lowry O. H. et al., 1951), після осадження та гідролізу білка (Меньшикова Н. П., Северин С. Е., 1979), визначали вміст вуглеводних сполук та ліпідів (Дроздов Н. С., 1970). Тейхоєві кислоти визначали за методом Baddiley J., Davison A. L., 1961. Кількість молочної кислоти («Лактат-01-Вітал», ТОВ «Вітал діагностика», РФ), неорганічного фосфору, калію, кальцію, натрію, хлору, заліза (Human, Німеччина), цинку («Zink-DAC.Lq»), міді («Copper-DAC.Lq» (DAC-SpectroMed s.r.l., Молдова), магнію («Для визначення магнію в біологічних рідинах з ксилідиловим синім», ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна) встановлювали згідно з інструкціями, використовуючи біохімічний аналізатор Sapphire-400 (Японія). Аналіз протеїново-пептидного складу з визначенням молекулярних мас фільтратів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 здійснювали за допомогою високоефективної рідинної гель-проникаючої хроматографії (LKB, Швеція). Визначення сирого протеїну здійснювали класичним методом К'єльдаля згідно з міждержавним нормативним стандартом ISO 5983–1: 2005 (Geneva, Switzerland), амінокислот відповідно до нормативного положення ISO 13903:2005 за допомогою іонообмінної колонкової хроматографії (амінокислотний аналізатор ААА 339 М «Мікротехна»), триптофану – високоефективною рідинною хроматографією (Мартинов А. В. та ін., 2019).

Токсикологічні дослідження БАР в тестах in vivo проводилися в межах українського (національного) та міжнародного законодавства. Випробування проходили з врахуванням загальних принципів досліджень на лабораторних тваринах, схвалених І Національним конгресом біоетики (20. 09. 01 р., м. Київ, Україна), з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.), відповідно до вимог положення «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та з урахуванням Директиви Європейського співтовариства № 2010/63/ЄС про захист тварин, які застосовують з науковою метою.

Рандобрендних лабораторних мишей обох статей розподіляли на дослідні та контрольні групи по 5 – 10 – 20 особин в кожній, в залежності від виду випробувань. Вивчення проводили відповідно до методик: гостру токсичність – топічне нанесення на депільовану поверхню тіла мишей (Testing of chemicals of health hazard. Basic requirements for tests for acute dermal toxicity, 2014), токсичність при одноразовому внутрішньошлунковому й внутрішньоочеревинному введеннях (наказ МОЗ України № 944, 2009; Доклінічне вивчення безпеки лікарських засобів біотехнологічного походження, 2011), порівняльне дослідження з препаратами PREEMA або BULARDI (EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev.1 «Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues», 2014), місцевоподразювальну дію (МУ 1.2.1105-02, 2002), кон'юнктивальну пробу – на мурчаках (Старцева Н. В., 2004).

Вивчення впливу БАР L. rhamnosus GG та S. boulardii в тестах in vitro на метаболічну активність ембріональних фібробластів з ембріонів миші (Jozefczuk J. et al., 2012) й спленоцитів із селезінки миші (Anikina L. V. et al., 2014; Riss T. L. et al., 2016; Präbst K., 2017) проводили за стандартними методиками з застосування МТТ-реагенту (безбарвну сіль тетразолію [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Chemical Co.)) і Alamar Blue («Serotec Ltd») відповідно. Кількість відновленого флуоресцентного барвника в присутності досліджуваних фільтратів (5 % та 20 %) визначали за інтенсивністю флуоресценції, використовуючи рідер Elise microplate reader with PC software UTRAO SM 600 («Utrao», China).

Антиадгезивні властивості речовин лактобактерій і сахароміцетів вивчали спектрофотометричним методом відповідно до методик (Иванов А. Г., Оборин В. А. 2008; Пирог Т и др.., 2014) за двома напрямами: адгезія бактеріальних клітин *S. aurues* ATCC 6538 P (209-P), оброблених БАР, та клітин *S. aurues* до еритроцитів людини, оброблених БАР. Кінцева концентрація фільтратів (дослід) або 0,9 % розчину натрію хлориду (контроль) – ~ 20 % від загального об’єму, *S. aurues* – ~ 10^7 КУО/мл.

Протибіоплівкові властивості КС та МК на процес формування й 24-годинні сформовані біоплівки різними збудниками вивчали спектрофотометричним методом за методикою Stepanović S. et. al., 2007. Кількість мікроорганізмів становила ~ 10^7 КУО/мл, концентрація метаболітів –

(~ 20 % загального об'єму), поживне середовище – триптиказо-соєвий бульйон (ТСБ (HiMedia, Індія) з додаванням 1 % глюкози).

Досліджували різні умови зберігання фільтратів бульйонних культур, КС і МК (з вихідною посівною дозою продуцентів 1,0 та / або 10,0 од. McFarland): у рідкому стані у гіпотермічних умовах при температурі (4 ± 1) ºС (холодове зберігання) й у замороженому стані при температурі (–23 ± 1) °С (заморожені) впродовж 60 діб і для більш тривалого зберігання – 6 місяців (термін спостереження); у ліофілізованому стані за умов гіпотермії при температурі (4 ± 1) °С (ліофілізовані) протягом 60 діб (термін спостереження).

Визначення мінімальних інгібуючих (пригнічуючих) (МІК) та бактерицидних (МБцК) концентрацій МК здійснювали мікрометодом серійних розведень у бульйоні Мюллера-Хінтона («Merck», Німеччина), відповідно до методик (Наказ МОЗ України № 167, 2007; EUCAST, 2017– 2019). Концентрації ML (від 1,1 мг/мл до 0,03 мг/мл білка) і MLS – (0,83 мг/мл до 0,02 мг/мл білка), загальний білок визначали за методом Lowry O. H. НК та ПК – живильне середовище з фільтратами або культурами відповідно. Ступінь інгібування бактерій обчислювали за формулою Sudagidan M., Yemeniciog˘lu A., 2012.

Методика *визначення інгібуючих концентрацій МК відносно біоплівкових форм (БІК)* мікроорганізмів відповідала МІК, тільки в якості живильного середовища використовували ТСБ з додаванням 1 % глюкози, інкубували 22 години при температурі (37 ± 1) °С, далі відповідно до методики Stepanović S. et al., 2007. БІК вважали найнижчі концентрації МК, які пригнічували ріст мікроорганізмів у стані біоплівок. Ступінь інгібування біоплівкових форм культур обчислювали за формулою Sudagidan M., Yemeniciog˘lu A., 2012.

Дослідження чутливості тест-штамів бактерій до антибактеріальних препаратів у комбінації з БАР проводили за загальноприйнятими методиками (Наказ МОЗ України № 167, 2007; EUCAST, 2017– 2019). Перед використанням методики мікроорганізми (5,0 од. McFarland) попередньо інкубували у фільтратах (з різною початковою концентрацією продуцентів – 1,0 та 10,0 од. McFarland) (дослід) або 0,9 % розчині натрію хлориду (контроль) у співвідношенні 1:1 протягом 1 години при температурі (35 ± 1) °С. Після чого оптичну густину проб доводили до 0,5 од. McFarland, подальше дослідження відповідало методиці. Формували набір АБ із різних груп відповідно до документів (Наказ МОЗ № 167, 2007; Волянський Ю. Л., 2014; EUCAST, 2017 – 2019).

Одночасне комбіноване застосування біологічно активних речовин L. rhamnosus GG і *S. boulardii з антибактеріальними препаратами* вивчали за допомогою диско-дифузійного методу Kirby-Bauer, модифікованого Sharma J. et al. 2014 p. і 2015 p.

Визначення МІК антибіотиків окремо або у комбінації з МК відносно антибіотикорезистентних штамів бактерій (*P. aeruginosa* PR № 35, *E. faecalis* PR № 95, *L. amnigena* PR № 284) здійснювали класичним мікрометодом серійних розведень (Наказ МОЗ України № 167, 2007; EUCAST, 2017– 2019). Дослідні проби містили бульйон Мюллера-Хінтона, суспензію мікроорганізмів і різні концентрації АБ окремо (амікацин – аміцил, ПАТ "Київмедпрепарат", Україна і

ципрофлоксацин, ТОВ «Новофарм-Біосинтез», Україна) або у комбінації з ML, MLS, MS, які використовували в бактеріостатичних концентраціях щодо обраних збудників.

Протимікробні властивості ML та MLS в тестах in vivo вивчали на двомісячних мурчаках обох статей масою 250 – 260 г. Відкриті рани (площею 4 $см^2$) інфікували суспензією добової культури антибіотикорезистентного штаму *P. aeruginosa* у концентрації 10,0 од. McFarland.

Дослідження протимікробної активності ML на моделі ран мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом P. aeruginosa PR № 0924. Контрольна група – тварини, яким наносили 0,9 % розчин натрію хлориду, Л дослідна група (лікувальне застосування) – ML на інфіковані рани, та П дослідна група (профілактичне та лікувальне застосування) – безпосередньо перед інфікуванням на рани наносили ML, а далі його застосовували, як і в групі Л – щоденно, двічі на добу. Додаткова контрольна група – мурчаки безпосередньо перед інфікуванням рани отримували 0,9 % розчин натрію хлориду (контроль профілактично-лікувальної групи). Доза ML становила ~ 0,4 мг/кг або ~ 0,8 мг/кг або ~ 1,5 мг/кг за вмістом загального білка на тварину (обробляли і прилеглі ділянки).

Вивчення протимікробних властивостей при комбінованому впливі MLS та амікацину (амікацину сульфат, «Лекхім-Харків») проводили на моделі ран мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* №. 35, який мав резистентність до гентаміцину та чутливість до амікацину (Наказ МОЗ № 167, 2007), що свідчить про спроможність ферменту AAC (3)-1 експресуватися на низькому рівні (EUCAST, 2019). На інфіковані рани наносили: 0,9 % розчин натрію хлориду (К), амікацин – АБ (група Л I), MLS одночасно з АБ (група Л II), MLS послідовно з АБ (група Л III) щоденно, двічі на добу. Доза MLS становила ~ 0,8 мг/кг за вмістом загального білка на тварину (обробляли і прилеглі ділянки).

Проводили мікробіологічні та планіметричні дослідження. У зразках матеріалу інфікованих ран ідентифікували і визначали КУО ((lg) КУО/$см^2$) збудника (Xu L., et al., 2007; Heunis T. D., et al., 2013). Визначення розмірів ран здійснювали на певну добу після інфікування з наступним розрахунком загальної площі рани в $см^2$ (Heunis T. D. et al., 2013). Площу і швидкість загоєння рани розраховували за формулою (Булыга Л. А. и др., 2015).

Статистичну обробку результатів експериментів здійснювали з використанням програмних пакетів «Excel 2007, 2010» («Microsoft», США) та «Statistica 8.0, 10.0» (StatSoft Inc., США). Всі досліди проводили в трьох – дев'ятьох повторах. Обчислювали середнє арифметичне (x), стандартне відхилення середнього арифметичного (SD), стандартну похибку (SE). Наявність відмінностей між середніми значеннями вибірок визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Множинні порівняння щодо виявлення достовірності різниць поміж отриманими показниками різних груп проводили із використанням параметричного критерію Стьюдента з поправкою за тестом Бонферроні та непараметричного критерію Манна-Уїтні. Кореляційний аналіз даних для перевірки зв'язку між

змінними проводили із застосуванням коефіцієнта кореляції (r) Спірмена та Пірсона. Відмінності вважали статистично значущими при значеннях $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Результати експериментальних досліджень. У дисертації приведені результати вивчення протимікробної активності похідних двох виробничих пробіотиків, які відносяться до представників прокаріот (*L. rhamnosus*) та еукаріот (*S. boulardii*). Згідно з даними літератури, *L. rhamnosus* проявляє високу антибактеріальну дію, а *S. boulardii* – ефекти, які нагадують захисні реакції нормальної здорової кишкової мікрофлори, та проявляють антитоксичну дію відносно ентеротоксинів і цитотоксинів (World Gastroenterology Organisation, 2008; Ehrhardt S. et al., 2016; Capurso L., 2019; Cabana M. D. et al., 2019; Kaźmierczak-Siedlecka K. et al., 2020). Це стало підставою для припущення щодо можливої взаємодоповнюючої характеристики їх нативних продуктів життєдіяльності.

Методичною основою досліджень є використання ультразвукових дезінтегратів різних пробіотичних штамів у якості факторів росту для нарощування мікробної маси продуцентів. Вирощування ML та MLp у власних ультразвукових дезінтегратах супроводжувалося збільшенням кількості колонієутворюючих одиниць на (~ 3,9) lg КУО/мл і (~3,5) lg КУО/мл відповідно ($p < 0,01$) й змінами рівню pH з ~ 5,8 до ~ 4,7 ($p < 0,05$), що свідчить про наростання біомаси мікробних клітин лактобактерій і закислення середовища (внаслідок синтезування органічних кислот у процесі життєдіяльності пробіотичних *Lactobacillus*).

Ультразвукові дезінтеграти пробіотиків здатні забезпечувати життєдіяльність не тільки власних продуцентів, але й інших культур пробіотичних мікроорганізмів. Вирощування *L. plantarum* в дезінтегратах *L. rhamnosus* GG та *E. faecium, L. rhamnosus* GG в дезінтегратах *L. plantarum* також сприяло збільшенню біомаси зазначених бактерій ($p < 0,05$). Отримання MS, LS, L_pS, ES, MLS супроводжувалося статистично достовірним збільшенням життєздатних клітин пробіотика на (~ 3,5) lg КУО/мл ($p < 0,01$), L_rL_p, EL_p, L_pL_r ($p < 0,05$). Слід відзначити, що досліджувані ультразвукові дезінтеграти не проявляли універсальну здатність щодо вирощування окремих представників мікрофлори. Не спостерігалося розмноження пробіотичних клітин *E. faecium* в дезінтегратах *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum, S. boulardii,* а *L. plantarum* – в *S. boulardii*.

Розроблений метод дає можливість спростити технологію отримання біологічно активних речовин (відсутність потреби очищувати субстрат від залишків живильного середовища), раціонально використовувати виробничі ресурси (поєднання послідовних етапів отримання КС і МК в єдиний процес), скорочення технології одержання комбінованих метаболітів (одночасне спільне культивування різних видів мікроорганізмів).

Пропонується ввести при одержанні комплексних речовин натуральні поживні середовища, зокрема ультразвукові дезінтеграти пробіотиків, з відомими рецептурними складовими. До складу БАР входять білки (35 – 67 %),

домінуюча кількість яких представлена пептидами (з молекулярними масами ~ 4,2 – 5,7 кДа в L – ~ 62 %, ML – ~ 53 %, MLS – ~ 49 %, S – ~ 12 % і з молекулярною масою ~ 1,1 кДа в L – ~ 17 %, ML – ~ 21 %, MLS – ~ 25 %, S – ~ 27 %, MS – ~ 54 %, LS – ~ 61 %), амінокислоти, молочна кислота (19 – 62 %), вуглеводи, ліпіди (L – 1,27 %, ML – 0,65 %, MLS – 0,34 %, S – 1,0 %, MS – 0,89 %, LS – – 0,85 %), тейхоєві кислоти (L – 2 %, ML – 1 %, MLS – 2 %, S – 7 %, MS – 5 %, LS – 3 %) та мінеральні речовини (магній, цинк, мідь).

Всі МК, за пілотним якісним методом дослідження, є високопротимікробними речовинами відносно *E. coli* № 366, *S. haemolyticus* № 1, *C. d. gravis* tox + № 149, *E. faecalis* № 47, *P. mirabilis* № 2349. Антибактеріальна активність ультразвукових дезінтегратів (*L. rhamnosus* GG, *L. plantarum*, *S. boulardii*) поступається аналогічним показникам МК. При цьому похідні пробіотичних лактобактерій проявляють бактерицидну дію вже при двохгодинній експозиції, тоді як метаболіти сахароміцетів подавляють розмноження тест-культур, як правило, через 24 або 48 годин. Високу протимікробну активність фільтрати *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 мали стосовно *Corynebacteria non diphtheriae* spp. та *Corynebacterium* tox + spp. Однієї години інкубації в речовинах ML і MLS було достатньо для елімінації окремих культур коринебактерій (*C. d. gravis* tox + № 33, *C. d. belfanti* tox – № 10356, *C. ulcerans* tox – № 104, *C. xerosis* № 2635). Серед зазначених вище МК для подальших випробувань було обрано речовини з більш вираженими протимікробними властивостями: ML (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* № 28, *E. cloacae* № 269), MLS (*Corynebacterium* spp.), LS переважали ES відносно *E. faecalis* № 47, *P. mirabilis* № 2349. Також LS активніші за MS відносно *E. faecalis* № 269, *P. mirabilis* № 2349, *P. vulgaris* № 714, *S. haemolyticus* № 2, *S. aureus* № 7. Комплекс LS містив клітинні структури пробіотичних лактобактерій і метаболіти пробіотичних сахароміцетів, що дало можливість проявити взаємодоповнюючі ефекти похідних прокаріот та еукаріот.

Виражену протимікробну дію КС та МК лактобактерій і сахароміцетів підтверджено кількісним методом оцінки при різних посівних дозах збудників (0,05 ум. од. та 1,0 од. McFarland). Двохгодинна експозиція бактерій з концентрацією 0,05 ум. од. McFarland в речовинах супроводжувалася втратою життєздатності *Corynebacteria* tox + spp., *Corynebacteria non diphtheriae* spp., *C. xerosis* PR № 8 (ML, MLS, S, MS, LS), *L. amnigena* PR № 284, *A. baumannii* PR № 9, *P.aeruginosa* PR № 13 (L, ML, MLS), *K. pneumoniae* PR № 179 (ML, MLS). Вплив упродовж двох годин БАР на мікроорганізми з більшими концентраціями (1,0 од. McFarland) сприяв пригніченню розмноження етіологічно значущих збудників хвороб. Інгібування *Corynebacteria* tox + spp. (n = 10) відбувалося на (58,76 ± 1,7) % (L), (79,18 ± 5,8) % (ML), (91,17 ± 8,2) % (MLS), (42,16 ± 5,2) % (S), (46,25 ± 5,4) % (MS), (87,75 ± 7,4) % (LS) відносно контролю ($p < 0,05$). Спільне культивування сахароміцетів і лактобактерій в ультразвукових дезінтегратах пробіотиків дозволило посилити інгібуючу дію

MLS проти патогенних коринебактерій в 2,4 раза порівняно з ML ($p < 0,05$). Пригнічення мікробних клітин *Corynebacteria non diphtheriae* spp. (n = 8) відмічалося на (61,23 ± 2,8) % (L), (74,59 ± 6,3 %) (ML), (87,97 ± 9,5) % (MLS), (39,57 ± 2,6) %(S), 51,55 ± 0,4) % (MS), (75,77 ± 6,4) % (LS) щодо контрольних проб ($p < 0,05$). Інгібування *C. xerosis* PR № 8 під впливом БАР відбувалося на (56,48 ± 8,18) % (L), 100 % (ML, MLS), (40,27 ± 2,5) % (S), (41,62 ± 2,2) % (MS), (43,92 ± 2,5) % (LS) у порівнянні з контролем ($p < 0,05$). Обраний штам *C. xerosis* PR № 8 проявляв резистентність відносно фторхінолонів, тетрациклінів, аміноглікозидів, макролідів, пеніцилінів, помірну стійкість до рифампіцину, чутливість до лінезоліду, ванкоміцину. Зазначені результати мають важливе значення, оскільки в світі спостерігається збільшення кількості резистентних до АБ штамів *Corynebacteria* (МУК 4.2.3065-13 Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции, 2013). Двогодинної інкубації з речовинами виявилося достатньо для вірогідного зниження життєздатності антибіотикорезистентних мікроорганізмів відносно контролю: *L. amnigena* PR № 284 на (31,28 ± 1,3) % (L), (34,23 ± 1,1) % (ML), (32,89 ± 1,3) % (MLS), *A. baumannii* PR № 9 на (43,92± 0,4) % (L), (51,95 ± 1,3) % (ML), (51,36 % ± 1,5) (MLS), *P.aeruginosa* PR № 13 на (43,92 ± 3,7) % (L), 100 % (ML), (39,59 ± 6,9) % (MLS), *K. pneumoniae* PR № 179 на (65,33 ± 7,54) % (L), (37,33± 4,3) % (ML), (37,07± 4,6) % (MLS).

За спектрофотометричним методом випробування встановлено значне інгібування ростових властивостей *P. aeruginosa* PR № 14 після 5 годинного впливу речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 – в межах (73,9 – 95,7) %, *L. amnigena* PR № 284 (70,5 – 93,4 %), *K. pneumoniae* PR № 179 (45,1 – 96,7) % ($p < 0,05$), максимальний ефект відбувався в присутності ML. При збільшенні експозиції культивування до 24 годин всі речовини бактерицидно діяли (100 % інгібування) на *P. aeruginosa* PR № 14, *L. amnigena* PR № 284, *K. pneumoniae* PR № 179, за виключення S, LS, які пригнічували *K. pneumoniae* PR № 179 на 52,7 – 61,6 %.

Встановлена достатність короткочасної експозиції для пригнічення гемолітичної активності *S. aureus* № 7 ML, MLS (2 години), L, S, MS, LS (24 години) і *C. d mitis* tox + № 167 в ML, MLS, LS (2 години), лецитовітелазної активності *S. aureus* № 7 L, ML, MLS, S, MS, LS (2 години) при високій концентрації збудників (1,0 од. McFarland) (табл. 1). Інгібування гемолітичної активності спостерігалося у двох коагулазонегативних штамів *S. haemoliticus* в пробах ML, а виросли колонії були неправильної форми, шорсткі, з нерівними краями, плескаті, дрібні за розміром. При збільшенні терміну до 24 годин пригнічення гемолітичної активності *S. haemoliticus* відбувалося під впливом LS (обидва штами) та S, MS (*S. haemoliticus* № 1), що свідчить про підвищення властивостей метаболітів сахароміцетів при їхньому культивуванні в ультразвукових дезінтегратах інших пробіотичних мікроорганізмів, ніж у власних.

Таблиця 1

Вплив клітинних структур і метаболітних комплексів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів на окремі ознаки та фактори патогенності мікроорганізмів

Тест-культури	Час експозиції, год	L	ML	MLS	S	MS	LS
		ріст / гемоліз / лецитиназа					
S. aureus № 7	2	+/+/-	+/-/-	+/-/-	+/+/-	+/+/-	+/+/-
	24	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/-/-	+/-/-	+/-/-
S. haemoliticus № 1	2	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	24	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-
S. haemoliticus № 2	2	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	24	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-
C. d. mitis tox +№ 167	2	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-
	24	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Примітки: + – наявність росту / гемолізу / лецитинази; – – відсутність росту / гемолізу / лецитинази – – наявність впливу метаболітних комплексів на дані ознаки.

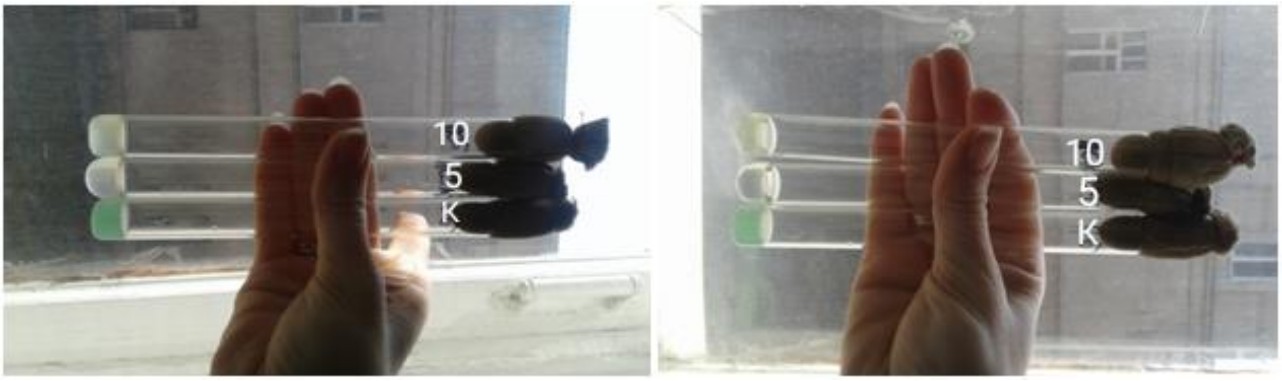
Результати впливу БАР на гемолітичну активність і продукування пігментів (піоціаніну, піорубіну, піовердину) залежали від концентрації *P. aeruginosa* (1,0 од., 5,0 од., 10,0 од. McFarland), їх індивідуальної чутливості до дослідних речовин та тривалості експозиції (2 – та 24 години) (табл. 2, рис. 1). Залежно від зазначених параметрів, а також активності дослідних речовин, відбувалася втрата життєздатності (ML, 1,0 од. McFarland, 2 години) або інгібування гемолітичних властивостей (L, MLS, 2 години) та / або пригнічення продукування пігментів псевдомонад (MLS – піоціаніну / піовердину, L – піорубіну, 2 години). Підвищення кількості мікроорганізмів до 5,0 од. McFarland супроводжувалося: пригніченням гемолітичної активності *P. aeruginosa* № 13 і накопичення пігментів (піоціаніну й піовердину) (ML / MLS, 2 години), елімінацією *P. aeruginosa* № 139 (ML, 2 години). Інгібування продукування пігментів (*P. aeruginosa* № 13, *P. aeruginosa* № 139) та гемолітичної активності (*P. aeruginosa* № 13) з початковою концентрацією мікробних клітин 10,0 од. McFarland встановлено при застосуванні ML (табл. 2). Виросли колонії були неправильної форми та дрібними за розміром. Повна елімінація всіх представників відбувалася після впливу впродовж 24 годин ML, *P. aeruginosa* № 139, *P. aeruginosa* № 14 – L, MLS. Витримка *P. aeruginosa* № 13 (10,0 од. McFarland, 24 години) в L і MLS сприяла пригніченню накопичення піоціаніну та гемолітичної активності (рис. 1).

Таблиця 2

Вплив фільтратів пробіотичних штамів лактобактерій на окремі ознаки та фактори патогенності культур *Pseudomonas* spp.

Тест-культури (пігмент)	Час експозиції, год	Початкова оптична густина суспензій культур, одиниці McFarland	L	ML	MLS
			ріст / пігмент / гемоліз		
P. aeruginosa № 13 (піоціанін)	2	1	+/+/-	-/-/-	+/-/-
		5	+/+/-	+/-/-	+/-/-
		10	+/+/+	+/-/-	+/+/+
	24	1	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+/-/-	-/-/-	-/-/-
		10	+/-/-	-/-/-	+/-/-
P. aeruginosa № 139 (піорубін)	2	1	+/-	-/-	-/-
		5	+/-	-/-	+/+
		10	+/+	+/-	+/+
	24	1	-/-	-/-	-/-
		5	-/-	-/-	-/-
		10	-/-	-/-	-/-
P. aeruginosa № 14 (піовердин)	2	1	+/+	-/-	+/-
		5	+/+	+/-	+/-
		10	+/+	+/+	+/+
	24	1	-/-	-/-	-/-
		5	-/-	-/-	-/-
		10	-/-	-/-	-/-

Примітки: + – наявність росту / пігменту/ гемолізу, – – відсутність росту / пігменту/ гемолізу – – наявність впливу метаболітних комплексів на дані ознаки.



а б

Рис. 1. Вплив біологічно активних речовин L (а) та MLS (б) на продукування пігменту (піоціаніну) *P. aeruginosa* з різною початковою концентрацією мікробних клітин (10 – початкова концентрація мікробних клітин *P. aeruginosa*, що відповідає 10,0 одиницям за шкалою McFarland; 5 – початкова концентрація мікробних клітин *P. aeruginosa*, що відповідає 5,0 одиницям за шкалою McFarland; К – поживний бульйон з додаванням 1 % глюкози).

Результати впливу БАР на адгезію мікробних клітин стафілококу за зміною оптичної густини дослідних зразків незалежно від способу випробувань відносно контролю були близькі (рис. 2). Зазначені показники *S. aurues* АТСС 6538 Р (209-Р) за двома напрямами досліджень (після обробки стафілококу та обробки еритроцитів людини речовинами лактобактерій і сахароміцетів) максимально зменшувалися під впливом проб ML та LS (на 11,03 – 17,19 %, $p < 0,05$). Нижчі антиадгезивні властивості мали зразки, в яких застосовувалися L та MLS (на 4,12 – 5,63 %). Більшу активність щодо інгібування адгезії стафілококів проявив LS порівняно з MS: вірогідна різниця спостерігалася незалежно від способу обробки еритроцитів ($p < 0,05$) або клітин стафілококу ($p < 0,01$).

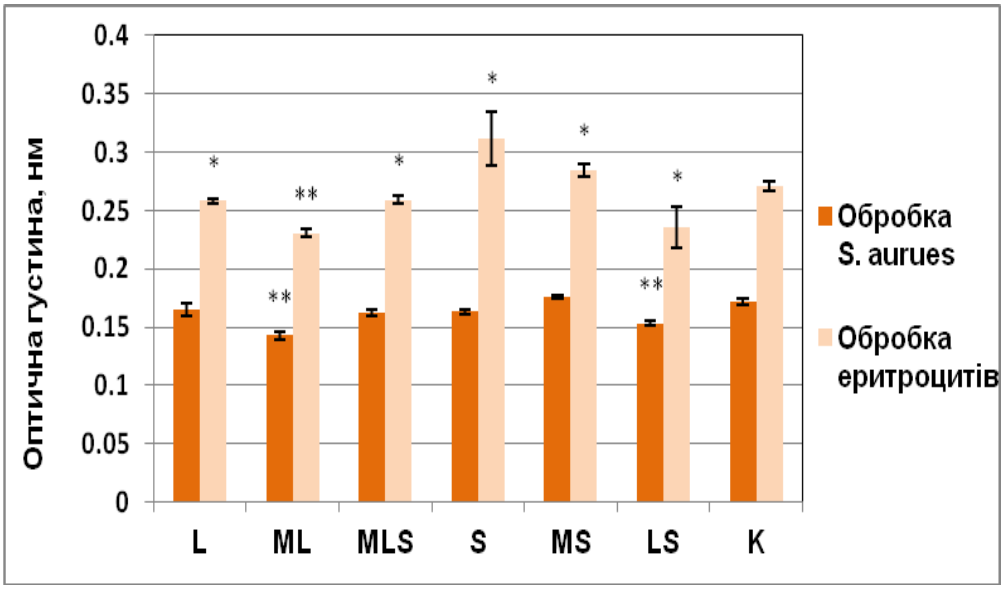


Рис. 2. Показники оптичної густини суспензій після обробки *S. aurues* АТСС 6538 Р (209-Р) або еритроцитів людини речовинами лактобактерій і сахароміцетів, де *– $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ дослідні показники відносно контрольних статистично значущі.

Здатність планктонних форм мікроорганізмів до формування біоплівок забезпечує виживання субпопуляції навіть в умовах інтенсивного застосування протимікробних препаратів. Вивчення впливу БАР на процеси біоплівкоутворення показало, що під впливом усіх проб процес утворення біоплівок антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 13 пригнічувався в 1,4 – 4,4 раза ($p < 0,05$), за виключенням LS (рис. 3). Вірогідне зниження біоплівкоутворення *K. pneumoniae* PR № 179 встановлено після застосування ML в 1,7 раза, MS в 1,3 раза, LS в 1,6 раза щодо контролю ($p < 0,05$). Дія всіх речовин проявлялася 100 % пригніченням процесу формування біоплівки *L. amnigena* PR № 284 ($p < 0,05$), крім LS – зниження біоплівкоутворення в 2,2 раза щодо контролю ($p < 0,01$). Інгібування утворення біоплівок референс-штамом *P. aeruginosa* АТСС 27853 спостерігалося при застосуванні всіх зразків на 65,9 – 99,1 % відносно контролю ($p < 0,05$).

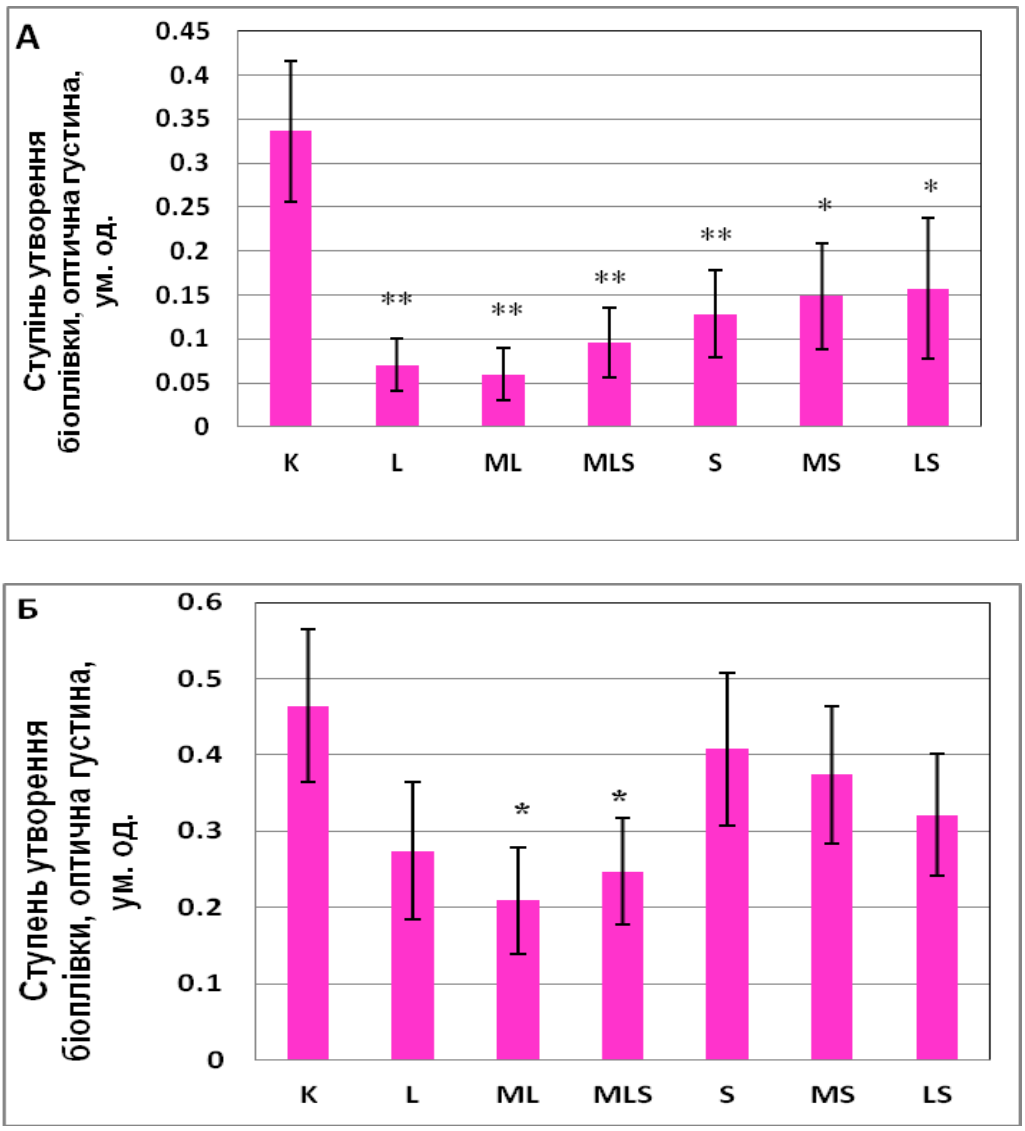


Рис. 3. Комплексна оцінка впливу біологічно активних речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 на формування (А) (n = 8) та сформовані 24-годинні (Б) (n = 6) біоплівки різними видами бактерій *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PR № 13, *K. pneumoniae* PR № 179, *L. amnigena* PR № 284, *Corynebacterium* spp.**,** де *– $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ дослідні показники відносно контрольних статистично значущі.

Найбільш виражену протибіоплівкову дію стосовно окремих коринебактерій (*C. d. gravis* tox+ № 108, *C. d. belfanti* tox+№ 147) щодо контролю проявила MLS ($p < 0,05$). Комплексна оцінка впливу БАР на здатність до утворення біоплівок різними бактеріями (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PR № 13, *K. pneumoniae* PR № 179, *L. amnigena* PR № 284, *Corynebacterium* spp.) супроводжувалася вірогідним зниженням оптичної густини всіх дослідних проб щодо контролю в 2,1 – 5,6 раза ($p < 0,05$) (рис. 3).

Результати протибіоплівкової активності БАР на сформовані біоплівки різними бактеріями (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PR № 13, *K. pneumoniae* PR № 179, *L. amnigena* PR № 284, *Corynebacterium* spp.) показали зниження оптичних густин в 2,2 раза після впливу ML, в 1,9 раза – MLS ($p < 0,05$), інших фільтратів у 1,1 – 1,7 раза відносно контролю (рис. 3).

Виражені протибіоплівкові, антиадгезивні властивості метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 щодо пригнічення бактерій у високих концентраціях (~ 10^7), свідчать про їх перспективність для боротьби з патогенними, антибіотикорезистентними збудниками на різних етапах розвитку інфекційного процесу.

Вивчення впливу низькотемпературного зберігання на протимікробні властивості бульйонних культур лактобактерій і сахароміцетів показало збереженість бактерицидної активності зразків, які знаходилися в гіпотермічних умовах, замороженому та ліофілізованому стані (протягом 60 діб), на рівні ефективності свіжих проб щодо *S. epidermidis* № 558, *S. aureus* ATCC 25923, *C. xerosis* № 41, *C. d. gravis* tox+ № 11, *P. aeruginosa* ATCC 27853. На антибіотикорезистентних ізолятах *S. aureus* PR № 2778, *S. haemoliticus* PR № 1520, *C. xerosis* PR № 305, *E. faecalis* PR № 87 доведено, що обрані умови збереження (–23 ± 1) ºС також не впливають на характер антибактеріальної дії клітинних структур і метаболітних комплексів, отриманих культивуванням продуцентів в ультразвукових дезінтеграторах, навіть при подовженні терміну витримки до 6 місяців. Шестимісячне зберігання фільтратів ультразвукових дезінтеграторів і метаболітів пробіотиків у замороженому стані при температурі (–23 ± 1) ºС не змінювало активності їх дії також і на процеси утворення біоплівок окремими представниками *Corynebacterium*. Проби L, ML, MLS і LS повністю пригнічували біоплівкоутворення тест-культур. Однак, тривала витримка (6 місяців) дослідного матеріалу пробіотичного походження у гіпотермічних умовах (4 ± 1) °С не забезпечувала збереження антибіоплівочної активності зразків лактобактерій і сахароміцетів. Слід відзначити, проби сахароміцетів (S, MS), які зберігалися у гіпотермічних умовах (4 ± 1) °С протягом 6 місяців, навпаки, сприяли посиленню утворення біоплівок у досліджуваних тест-культур. Оптимальними умовами та строком витримки дослідних речовин із збереженням їхніх протимікробних властивостей є зберігання в замороженому стані при (–23 ± 1) ºС впродовж 6 місяців (термін спостереження).

Результати впливу клітинних структур і метаболітних комплексів L. rhamnosus GG *та S. boulardii на метаболічну активність* ембріональних фібробластів миші, визначену за МТТ-тестом і спленоцитів миші, визначену за резазурин-тестом показали, що введення їх до середовища інкубації у концентрації 5 % не змінює активності тест-клітин. Підвищення кількості фільтратів до 20 % супроводжується зниженням метаболічної активності ембріональних фібробластів миші: L до (64,3 ± 4,16) %, ML до (56,19 ± 1,37) %, MLS до (67,7 ± 10,7) %, S до (88,7 ± 3,8) %, MS до (80,67 ± 6,8) %, LS до (75,94 ± 5,7) % і спленоцитів: L до (79,0 ± 6,4) %, ML до (58,8 ± 1,9) %, MLS до (52,6 ± 0,6) %, MS до (68,5 ± 4,1) % та LS до (64,7 ± 3,3) % відносно 100 % контролю ($p < 0,05$), що свідчить про залежність інтенсивності змін від концентрації дослідних речовин.

Експериментальне випробування безпечності за умов *in vivo.* Оскільки представлені натуральні біологічно активні речовини *L. rhamnosus* ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 – це платформа нового напряму створення

протимікробних препаратів з поліфункціональними властивостями та їхнього використання, у тому числі для зовнішнього застосування в людини (шкіра, рани), було досліджено їх токсичність при різних шляхах введення лабораторним тваринам. При однократному топічному нанесенні нативних речовин (без розведення) на депільовану поверхню тіла мишей (крім голови і лап) у дозі 25 мл/кг, а також при внутрішньошлунковому у дозі 25 мл/кг і внутрішньоочеревинному введенні у дозі 25 мл/кг, будь-яких проявів токсичності не спостерігалося. Це свідчить про безпечність досліджуваних речовин (Стефанов О. В., 2001; Сидоров К. К., 2002).

У порівняльному дослідженні, при внутрішньошлунковому введенні, встановлена безпечність досліджуваних речовин, як і препаратів (PREEMA або BULARDI, Schonen, Швейцарія). Результати випробувань фільтратів на ушкоджену поверхню тіла мишей (впродовж 14 днів) або на слизові оболонки ока мурчаків (протягом 7 днів) показали відсутність негативного впливу та місцевоподразнювальної дії в обох тестах.

Високий рівень *протимікробної активності ML та MLS підтверджено на референтних штамах* мікроорганізмів. МІК ML для *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила 0,27 мг/мл білка, а для MLS – 0,21 мг/мл білка. ML з концентрацією 0,14 мг/мл білка елімінував культуру *P. aeruginosa* ATCC 27853. Невисокі концентрації ML (0,03 мг/мл білка) та MLS (0,02 мг/мл білка) оказували бактеріостатичну дію на *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, яка проявлялася зниженням оптичної густини на (77,16 – 82,3) %, (51,25– 52,78) %, (31,43 – 31,58) % відповідно контролю ($p < 0,05$). Встановлена залежність інтенсивності протимікробної дії від концентрації ML / MLS та тривалості культивування по відношенню до всіх еталонних тест-штамів мікроорганізмів.

Вивчення МІК і БІК речовин L. rhamnosus GG ATCC 53103 та *S. boulardii* CNCM I-745 щодо антибіотикорезистентних бактерій підтвердило високий рівень активності відносно обох форм мікроорганізмів. Однакові бактерицидні концентрації ML / MLS встановлено для планктонних і біоплівкових форм *C. xerosis* PR № 2635, *L. amnigena* PR № 284 (ML – ≤ 0,03 мг/мл білка і MLS – ≤ 0,02 мг/мл білка), *P. aeruginosa* PR № 0924 (ML – 0,27 мг/мл білка та MLS – 0,21 мг/мл білка) (табл. 3). Протимікробна активність ML була однакова (0,27 мг/мл білка) відносно обох форм *E. faecalis* PR № 51, а MLS – вища для біоплівок (0,41 мг/мл білка) ніж для планктонних клітин даного мікроорганізму (0,21 мг/мл білка). БІК ML та MLS щодо стійких культур *S. aureus* PR № 2818, *K. pneumoniae* PR № 5055 також перебільшували МІК вдвічі. Для ML дані показники були однакові (МІК – 0,55 мг/мл білка, БІК – 1,1 мг/мл білка), а для MLS відрізнялися (МІК і БІК щодо *S. aureus* PR 0,41 мг/мл білка та 0,83 мг/мл, а *K. pneumoniae* PR № 5055 0,21 мг/мл білка та 0,41 мг/мл білка відповідно).

Представлені речовини ML / MLS (в невеликих концентраціях) мають високий рівень протимікробної та протибіоплівкової активностей, що доводить їх перевагу перед метаболітами, одержаними іншими авторами на традиційних живильних середовищах. Пріоритетність, напевно, обумовлена підвищенням антибактеріальних властивостей кінцевого продукту завдяки

поєднанню ефективності дезінтеграту та метаболітів, яке передбачено авторськими способами отримання метаболітних комплексів. Також виражена антибактеріальна дія речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 по відношенню до широкого спектру мікроорганізмів забезпечена, ймовірно, комплексним впливом їхніх складових: низькомолекулярні пептиди, екзополісахариди, органічні кислоти, амінокислоти, оказують спільну протимікробну дію щодо збудників хвороб.

Таблиця 3

Зміни мінімальних інгібуючих концентрацій метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 (ML) та його комбінації з *S. boulardii* CNCM I-745 (MLS) для планктонних (МІК) і біоплівкових (БІК) форм антибіотикорезистентних штамів

Тест-штами	Інгібуюча концентрація метаболітних комплексів, мг/мл за загальним білком				Співставлення БІК щодо МІК	
	ML		MLS		ML	MLS
	МІК	БІК	МІК	БІК		
S. aureus PR № 2818	0,55	1,1	0,41	0,83	2 × МІК	2 × МІК
E. faecalis PR № 51	0,27	0,27	0,21	0,41	1 × МІК	2 × МІК
C. xerosis PR № 2635	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,02	≤ 0,02	1 × МІК	1 × МІК
P. aeruginosa PR № 0924	0,27	0,27	0,21	0,21	1 × МІК	1 × МІК
L. amnigena PR № 284	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,02	≤ 0,02	1 × МІК	1 × МІК
K. pneumoniae PR № 5055	0,55	1,1	0,21	0,41	2 × МІК	2 × МІК
Примітки.		- 1 МІК = 1 БІК			- 1 МІК = 2 БІК	

Пілотні результати комплексної оцінки комбінованого одночасного впливу фільтратів L. rhamnosus GG ATCC 53103 і S. boulardii CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами (азитроміцином, еритроміцином, цефотаксимом, цефтріаксоном, ампіциліном) показали збільшення зон затримки росту *Corynebacterium* spp. tox + на 2,2 – 2,7 мм ($p < 0,05$) відносно контролю, за виключенням проб S, MS (рис. 4).

Враховуючи попередні результати щодо ефективності короткочасної інкубації фільтратів з мікроорганізмами задля пригнічення лецитовітелазної / гемолітичної активностей, продукування пігментів збудників хвороб нами запропоновано новий підхід щодо застосування дослідних речовин. Він полягає в послідовному випробуванні: спочатку вплив фільтратів лактобактерій і сахароміцетів на культури бактерій, потім – визначення чутливості останніх до антибактеріальних препаратів. Преінкубацію патогенних збудників здійснювали в МК, отриманих за різними способами (авторськими і

традиційними) та з різною початковою концентрацією мікробних клітин пробіотичних штамів мікроорганізмів.

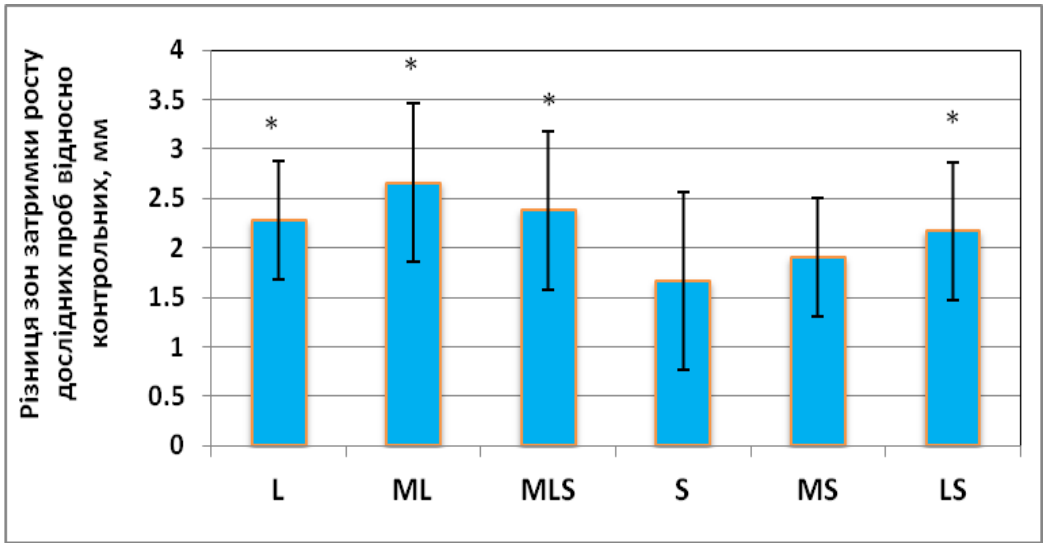


Рис. 4. Комплексна оцінка різниці діаметрів зон пригнічення росту *Corynebacterium* spp. tox + щодо спільного одночасного застосування клітинних структур і метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii* з антибактеріальними препаратами (азитроміцином, еритроміцином, цефотаксимом, цефтріаксоном, ампіциліном*)* по відношенню до контрольних проб (0,9 % розчин натрію хлориду), де *– $p < 0,05$ відмінності дослідних показників статистично значущі відносно контролю.

Попередня інкубація мікробних клітин Corynebacterium spp. tox + *в речовинах лактобактерій і сахароміцетів*, незалежно від способу отримання, підвищувала чутливість бактерій до АБ в різній мірі (рис. 5). При поєднанні речовин лактобактерій і сахароміцетів, одержаних обома представленими способами, з АБ із різних груп, а саме пеніцилінами, карбапенемами, цефалоспоринами, фторхінолонами, аміноглікозидами, макролідами, переважне збільшення чутливості токсигенних штамів коринебактерій відбувалося до пеніцилінів, карбапенемів і цефалоспоринів. Комплексна оцінка відносно всіх зазначених АБ показала максимальне вірогідне збільшення зон пригнічення росту *Corynebacterium* spp. tox + при послідовному застосуванні ML на 8,1 мм, $p < 0,05$ (висока початкова оптична густина продуцента, власний і традиційний способи), MLS на 6,8 мм $p < 0,05$ (висока оптична густина продуцента, власний спосіб), L на 6,6 мм, $p < 0,01$ щодо контролю (рис. 5). Вірогідної різниці між ML і MLS не встановлено ($p > 0,05$).

Наступне дослідження було проведено на стійких до певних антибіотиків, але чутливих до метаболітних комплексів (авторський спосіб отримання), антибіотикорезистентних штамах бактерій. Посилення комбінованого ефекту відмічалося як при послідовному впливі (попередня преінкубація мікроорганізмів в фільтратах пробіотиків підвищувала чутливість бактерій до антибіотиків), так і при одночасному застосуванні (завдяки збільшенню

протимікробної активності) МК та АБ. Одночасне випробування в будь-якій мірі поступалося послідовному впливу.

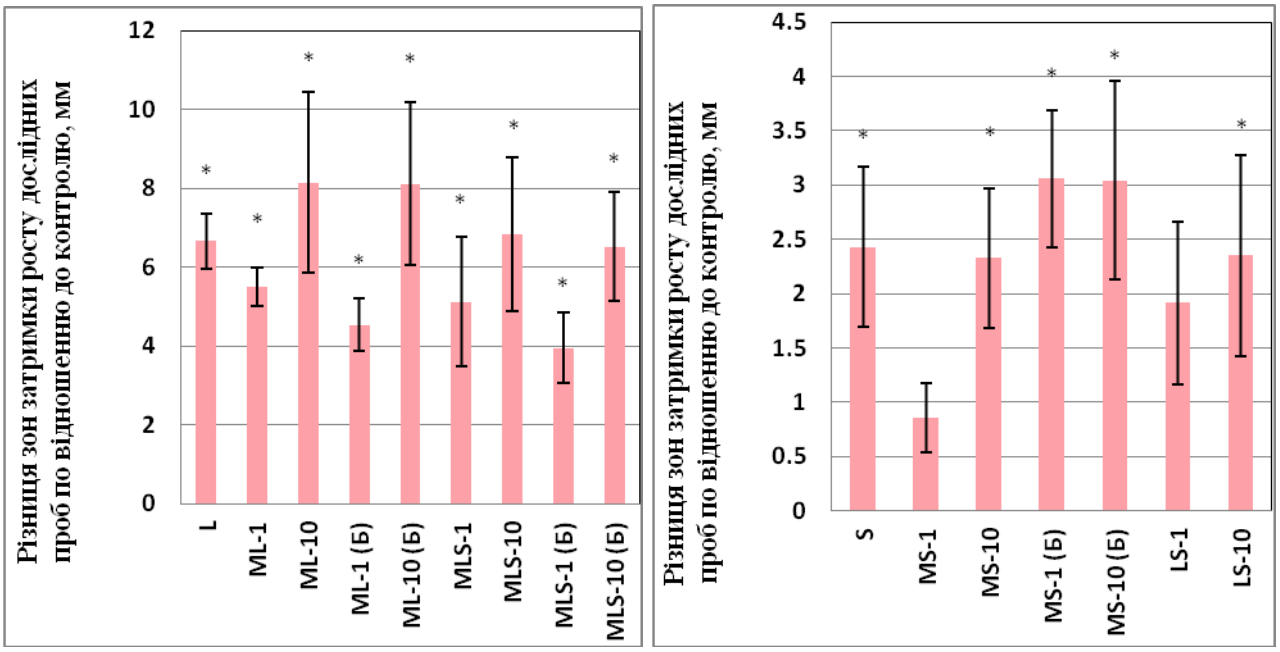


Рис. 5. Комплексна оцінка різниці діаметрів зон пригнічення росту *Corynebacterium* spp. tox + щодо спільного послідовного застосування клітинних структур і метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 та *S. boulardii* CNCM I-745, отриманих вирощуванням продуцентів у власних ультразвукових дезінтеграторах і поживному бульйоні з додаванням 1 % глюкози, з антибактеріальними препаратами (іміпенемом, ванкоміцином, цефотаксимом, гентаміцином, еритроміцином, ципрофлоксацином, пеніциліном), де *– $p < 0,05$ відмінності дослідних показників статистично значущі відносно контролю.

Комбіноване застосування МК з АБ супроводжувалося появою чутливості до амікацину (L, ML, MLS, S, MS, LS), цефотаксиму (L, ML, MLS, MS, LS) у помірно стійкого штаму *P. aeruginosa* PR № 1 при одночасному та послідовному застосуванні. Стійкий штам *K. pneumoniae* PR № 5055 виявив чутливість до амікацину (L, ML, MLS, S, MS, LS – послідовний вплив або тільки з ML, MLS, MS – одночасний), помірну-стійкість до левоміцетину (ML, MLS, MS – послідовний і одночасний) і тетрацикліну (MLS лише при послідовному), гентаміцину (чутливість при послідовному або помірну-стійкість при одночасному поєднанні з LS). Стійкий до левоміцетину штам *A. baumannii* PR № 18 при послідовному випробуванні з S, MS, LS виявив помірну стійкість на відміну від одночасного застосування. Аналогічний ефект відбувався при випробуваннях цефотаксиму з L. Також стійкий до ципрофлоксацину *A. baumannii* PR № 18 виявив помірну стійкість тільки при послідовному комбінуванні з ML, MLS, MS, LS. Менш виражена сприйнятливість резистентних збудників до антибіотиків при одночасному впливі, на відміну від поступового, свідчить про ефективність попереднього інкубування бактерій з БАР внаслідок чого відбувається підвищення чутливості

останніх за рахунок пригнічення факторів патогенності, а наступне застосування АБ зумовлювало більш виражений комбінований ефект.

Паралельно проведена інтерпретація зазначених даних за рекомендаціями EUCAST (2019). При послідовному випробуванні стійкий штам *P. aeruginosa* PR № 1 виявив сприйнятливість до комбінованого впливу амікацину з L, ML, MLS, MS, а при одночасному – з ML, MLS, MS. Резистентна культура *K. pneumoniae* PR № 5055 виявила чутливість до амікацину та гентаміцину з ML, MLS, MS (послідовний) або амікацину з ML, MLS (одночасний) і гентаміцину з MS (одночасний). Як видно, послідовний вплив більш ефективний порівняно з одночасним.

При комплексній оцінці спільного ефекту встановлено збільшення діаметрів зон пригнічення росту мікроорганізмів (*P. aeruginosa* PR № 1, *A. baumannii* PR № 18, *K. pneumoniae* PR № 5055, *L. amnigena* PR № 284) при поєднанні АБ з ML (на 5,1 мм, $p < 0,05$) та MLS (на 5,0 мм, $p < 0,05$) відносно контролю (рис. 6). Вірогідно більше підвищення протимікробної активності відбувалося при послідовному впливі антибіотиків з ML і MLS, ніж при одночасному ($p < 0,05$), для всіх обраних антибіотикорезистентних збудників.

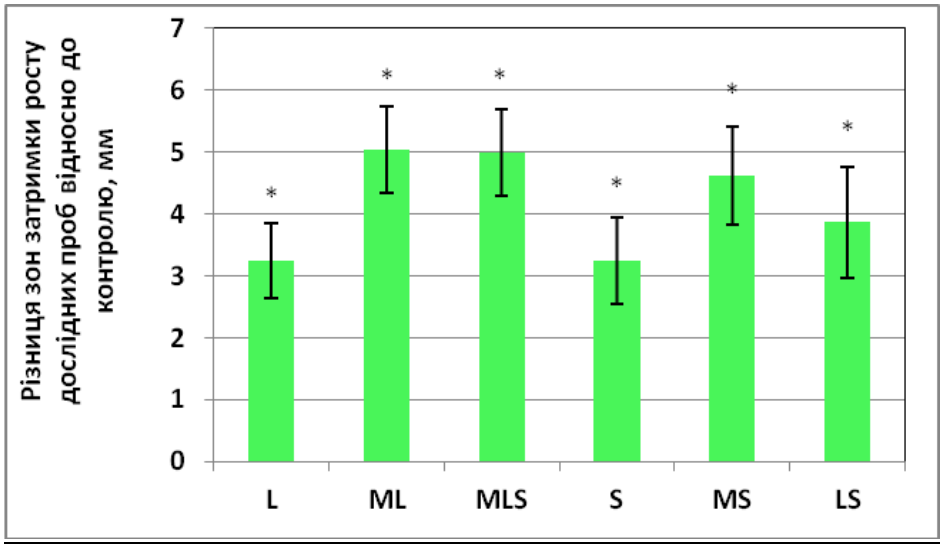


Рис. 6. Комплексна оцінка діаметрів зон пригнічення росту антибіотикорезистентних штамів *P. aeruginosa* PR № 1, *A. baumannii* PR № 18, *K. pneumoniae* PR № 5055, *L. amnigena* PR № 284 щодо спільного послідовного застосування клітинних структур і метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* з різними антибактеріальними препаратами ($n = 23$), де *– $p < 0,05$ відмінності дослідних показників статистично значущі відносно контрольних.

Підвищення антибактеріальної активності при комбінованому послідовному використанні БАР з АБ відбувалося у 88 % комбінацій з ML, 83 % – з MLS, 85 % – з MS, 73 % – з LS відносно різних видів бактерій *P. aeruginosa* PR № 1, *A. baumannii* PR № 18, *K. pneumoniae* PR № 5055, *L. amnigena* PR № 284, *S. aureus* PR № 2778, *S. haemoliticus* PR № 1520, *E. faecalis* PR № 87, *C. xerosis* PR № 365, *Corynebacterium* spp. tox + та супроводжувалося

збільшенням зон затримки росту на > 5 мм або тенденцією до підвищення комбінованої дії (рис. 7).

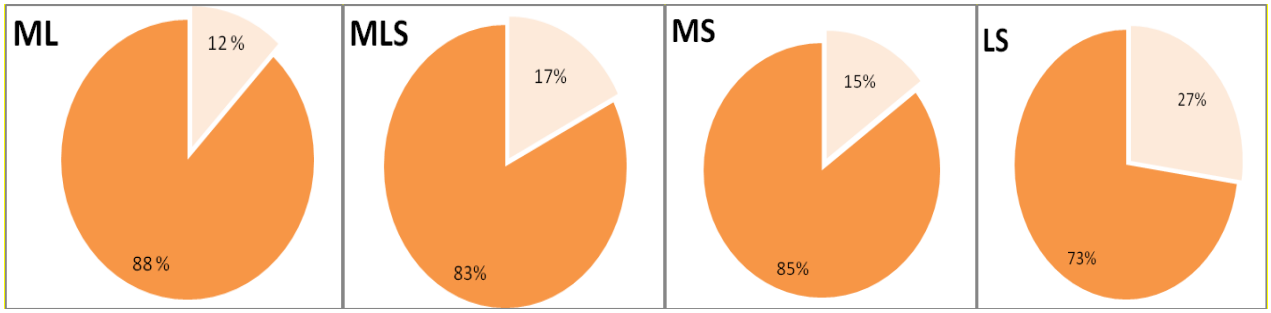


Рис. 7. Комбінована протимікробна активність дослідних речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 відносно різних видів бактерій *P. aeruginosa* PR № 1, *A. baumannii* PR № 18, *K. pneumoniae* PR № 5055, *L. amnigena* PR № 284, *S. aureus* PR № 2778, *S. haemoliticus* PR № 1520, *E. faecalis* PR № 87 *C. xerosis* PR № 365, *Corynebacterium* spp. tox + з послідовним використанням різних антибактеріальних препаратів (n = 42), де ■ – присутність підвищення комбінованої протимікробної активності відносно до загальної кількості випробуваних комбінацій антибіотик – мікроорганізм; ■ – відсутність підвищення комбінованої протимікробної активності відносно до загальної кількості випробуваних комбінацій антибіотик – мікроорганізм.

При спільному застосуванні ML з антибактеріальними препаратами в 11,9 % впливу не чинилося. Загальна кількість різних випробуваних комбінацій антибіотик – мікроорганізм – 42. В пробах комбінацій БАР – АБ, які проявили комбіновану протимікробну дію (кількість АБ 37 із 42), перевагу за збільшенням діаметрів зон пригнічення росту всіх випробуваних бактерій мали проби ML і MLS перед L ($p < 0,01$), що свідчить про більший ефект з метаболітними комплексами ніж з клітинними структурами (рис. 8). При комбінуванні різних АБ (n = 37) з ML посилення відбувалося на 5,5 мм, з MLS на 4,95 мм, MS на 3,96 мм відносно контролю ($p < 0,05$). Терапевтичну значимість має застосування ML і MLS, вірогідної різниці їхньої ефективності не встановлено ($p > 0,05$) (рис. 8).

Запропонований послідовний метод використання дослідних речовин МК + бактерія та АБ, який передбачає спочатку вплив метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 5310 і *S. boulardii* CNCM I-745 потім антибіотиків, дозволяє створювати велику кількість варіантів, які посилюють спільну антибактеріальну активність компонентів. Перевага даного способу полягає в можливості декілька разів проводити попередню обробку бактерій метаболітами, а одночасне використання МК + АБ не підлягає повторенню.

В роботі доведено збереження протимікробного ефекту метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 та *S. boulardii* CNCM I-745, після витримки за температури (–23 ± 1) ºС протягом 6 місяців (термін спостереження), при комбінованому з АБ випробуванні.

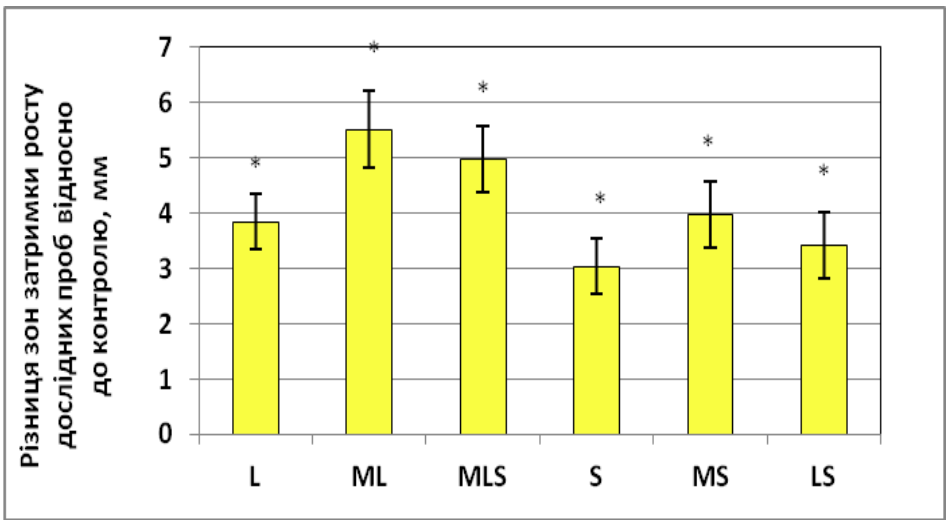


Рис. 8. Комплексна оцінка діаметрів зон пригнічення росту різних видів бактерій *P. aeruginosa* PR № 1, *A. baumannii* PR № 18, *K. pneumoniae* PR № 5055, *L. amnigena* PR № 284, *S. aureus* PR № 2778, *S. haemoliticus* PR № 1520, *E. faecalis* PR № 87 *C. xerosis* PR № 365, *Corynebacterium* spp. tox + щодо спільного послідовного застосування біологічно активних речовин *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* з різними антибактеріальними препаратами (n = 37 комбінацій метаболітний комплекс + мікроорганізм – антибіотик), де * – $p < 0,05$ відмінності дослідних показників статистично значущі відносно контрольних.

Важливим є встановлення МІК і МБцК різних комбінацій АБ амікацину (А) або ципрофлаксацину (Ц) з МК відносно *P. aeruginosa* PR № 35, *L. amnigena* PR № 284, *E. faecalis* PR № 95 (табл. 4).

Таблиця 4

Зміни МІК антибактеріальних препаратів при комбінованому застосуванні з метаболітними комплексами *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 та *S. boulardii* CNCM I-745, отриманими за авторськими способами

Антибактеріальні препарати	Антибіотикорезистентні тест-штами								
	P. aeruginosa PR № 35			*L. amnigena* PR № 284			*E. faecalis* PR № 95		
	метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*								
	ML	MLS	MS	ML	MLS	MS	ML	MLS	MS
Амікацин	8	8	4	–	–	–	–	–	–
Ципрофлоксацин	4	4	8	16	4	4	2	–	–

Примітки: 2 – 16 – наявність посилення ефекту (відбувалося зменшення МІК антибактеріального препарату, в кількість разів, ▭ – має діагностичне значення), «–» – відсутність посилення ефекту (зменшення МІК антибактеріального препарату не відбувалося), ▭▭▭ – перехід мікроорганізму з категорії «резистентний» / «помірно стійкий» в «чутливий».

Комбіноване застосування метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибіотиками спричиняло перехід бактерій з категорії «резистентна» або «помірно стійка» в «чутливу»: *P. aeruginosa* PR № 35 (при комбінуванні амікацину з ML, MLS, MS), *E. faecalis* PR № 95 (ципрофлоксацин з ML), *L. amnigena* PR № 284 (ципрофлоксацин з ML, MLS, MS) (EUCAST, 2019) (табл. 4).

Достовірно більша поєднана протимікробна дія МК + АБ відбувалася при бактерицидних і бактеріостатичних концентраціях останніх ($p < 0,05$). При комбінованому використанні дослідних фільтратів з певними субтерапевтичними концентраціями АБ є більше пригнічення росту та розмноження бактерій під впливом комбінацій МК + АБ, ніж виключно АБ. Це означає, що поєднане застосування речовин пробіотиків з антибіотиками в будь якому випадку, зокрема при відсутності зниження МІК препарату, в більшій мірі інгібує антибіотикорезистентні збудники, порівняно з окремим впливом АБ.

Антибактеріальна активність ML та MLS *in vitro* підтверджена в експериментах *in vivo*. *Вивчення протимікробних властивостей ML на моделі ран, інфікованих антибіотикорезистентним штамом P. aeruginosa* PR № 0924, *в мурчаків* показало недостатню ефективність діючої речовини в дозі ~ 0,4 мг/кг за вмістом загального білка на тварину. За показниками КУО збудника більшу ефективність ML мала для лікувального застосування в дозі ~ 1,5 мг/кг за вмістом білка на тварину, а для профілактично-лікувального – незалежно від випробуваних доз (~ 1,5 мг/кг або ~ 0,8 мг/кг за вмістом білка на тварину), що свідчить про недоцільність застосування більших концентрацій дослідних речовин з профілактичною метою (табл. 5).

Таблиця 5

Ефективність метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 при різних способах нанесення на рани, інфіковані антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 0924 в тестах *in vivo*

Групи (дози ML за вмістом білка на тварину)	Планіметричні показники / наявність збудника			Елімінація збудника	Перевага дослідної групи тварин до контрольної
	експеримент, доба				
	5	8	11		
К	+ / +	+ / +	+ / +	не наступила	
Л I (~ 1,5 мг/кг білка)	+ / +	+ / +	– / –	на 11 добу	
П I (~ 1,5 мг/кг білка)	+ / +	+ / +	– / –	на 11 добу	ШЗ – на 3 доби
Л II (~ 0,8 мг/кг білка)	+ / +	+ / +	+ / +	не наступила	
П II (~ 0,8 мг/кг білка)	+ / +	+ / +	– / –	на 11 добу	ШЗ – на 3 доби

Примітки: К – контрольна група, Л – лікувальне застосування, П – профілактичне та лікувальне застосування, ШЗ – швидкість загоєння, – – відсутність рани / збудника.

Найбільш інтенсивне загоєння ран в П І / П ІІ відбувалося в перші 5 діб експерименту, в Л І / Л ІІ – з 1 по 8 добу, в К – після 8 доби, відносно вихідних показників. Значення швидкості загоєння (ШЗ) контрольних ран на 11 добу (0,18) відповідало ранам груп П І / П ІІ на 8 добу експерименту (0,17 – 0,16), що передбачає прискорення загоєння майже на три доби (табл. 5).

Наступне експериментальне дослідження передбачало встановлення *in vivo* на моделі ран шкіри мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 35, ефективності одночасного (Л ІІ) та послідовного (Л ІІІ) застосування MLS (~ 0,8 мг/кг за вмістом білка на тварину) з амікацином (А – Л І). Клінічний прояв інфекційного процесу в рані мурчаків (почервоніння, набряк, виділення ранового ексудату) підтверджувався мікробіологічними показниками: рівень мікробної контамінації ран груп К, Л І, Л ІІ, Л ІІІ становив (6,6 ± 0,5 – 6,7 ± 0,4) lg КУО/см^2. На 5 добу експерименту кількість мікробних клітин збудника в ранах груп Л І, Л ІІ і Л ІІІ була нижче контрольних в 1,9, 2,2 та 2,8 раза, на 8 – в 3,1, 8,5 і 17,0 раза відповідно ($p < 0,05$) (табл. 6). Достовірна різниця щодо зниження КУО встановлена між лікувальними групами Л І та Л ІІІ ($p < 0,001$), а також Л ІІІ і Л ІІ (з 5 дня дослідження, $p < 0,05$), що доводить ефективність комбінованого послідовного застосування А та MLS у порівнянні з амікацином і одночасним спільним випробуванням.

Таблиця 6

Ефективність метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 при різних способах нанесення на рани, інфіковані антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 35 в тестах *in vivo*

Групи	Планіметричні показники / наявність збудника			Елімінація збудника	Перевага дослідної групи тварин до контрольної
	Експеримент, доба				
	5	8	11		
К	+ / +	+ / +	+ / +	не наступила	
Л І амікацин (А)	+ / +	+ / +	– / –	на 11 добу	
Л ІІ MLS і А одночасно	+ / +	+ / +	– / –	на 11 добу	
Л ІІІ MLS і А послідовно	+ / +	+ / +	– / –	на 11 добу	ЗПР: 5 доба Л ІІІ відповідна 8 доба Л ІІ

Примітки: К – контрольна група, Л – лікувальне застосування, ЗПР – загальна площа рани, – – відсутність рани / збудника.

Процеси загоєння інфікованих ран дослідних мурчаків на 5 добу випробування відповідали аналогічним змінам контрольних тварин у період з 8 по 11 добу: спостерігалося зниження ознак запалення, гіперемії оточуючих тканин, зменшення набряку. Вірогідна різниця загальних площ поверхонь ран

виявлена на 5 і 8 добу випробування в Л III порівняно з Л I (в 2,8 та 9,0 раза) і Л II (в 1,8 та 5,0 раза) відповідно ($p < 0,05$), що показує перевагу почергового нанесення на рани метаболітів потім антибіотиків, на відміну від їхнього одночасного впливу й окремого застосування амікацину. Зазначене підтверджено більш стрімким загоєнням ран, зокрема їхньої швидкості, в групах Л II і Л III відносно Л I ($p < 0,05$), а Л II поступалася Л III ($p < 0,05$). На 5 добу експерименту встановлено прискорений перехід ран обох груп дослідних тварин із фази запалення у фазу регенерації порівняно з інтактними мурчаками.

Перевага комбінованої терапії протимікробних препаратів із метаболітами пробіотичних штамів мікроорганізмів надасть можливість скоротити термін лікування гнійно-запальних хвороб (табл. 7).

Таблиця 7

Обґрунтування ефективності дослідних речовин в залежності від способу застосування МК та /або АБ

Групи	Спосіб застосування дослідних речовин	Ефективність
К	місцеве нанесення ФР	–
АБ	місцеве лікування АБ	протимікробна дія
МК	місцеве лікування МК	протимікробна, протибіоплівкова дії
П	профілактика утворення нагноєння, зниження вірогідності інфікування, виключення розвитку мікрофлори в рані	протимікробна, протибіоплівкова, антиадгезивна дії
МК з АБ одночасно	підвищення ефективності лікування антибактеріальними препаратами інфекційних хвороб, викликаних антибіотикорезистентними збудниками	протимікробна, протибіоплівкова дії, комбінований ефект з антибіотиками
МК з АБ поступово	підвищення ефективності лікування антибактеріальними препаратами інфекційних хвороб, викликаних антибіотикорезистентними збудниками	протимікробна, протибіоплівкова дії, комбінований ефект з антибіотиками, підвищення чутливості мікроорганізмів до АБ внаслідок інгібування факторів патогенності

Напевно, швидке загоювання ран та одужання мурчаків забезпечено протимікробними, антиадгезивними і протибіоплівковими властивостями ML / MLS, які встановлено в умовах *in vitro* на процес формування та попередньо сформовані біоплівки мультирезистентних умовно-патогенних і патогенних бактерій. Також, прискорене загоєння ран обумовлено безпосереднім нанесенням на рану багатокомпонентних за складом речовин лактобактерій і сахароміцетів, які відіграють ключову роль в успішному скороченні фази запалення та помітному наближенні фази регенерації.

При одночасному впливі ефект забезпечено комбінованою дією МК та АБ, а при послідовному застосуванні додатково підвищується чутливість мікроорганізмів до АБ, внаслідок пригнічення факторів патогенності бактерій МК, що виявлено за умов дослідження *in vitro*. Також встановлена ефективність попереднього профілактичного нанесення МК з можливістю зниження вірогідності інфікування, виключення розвитку в рані власної мікрофлори та мікрофлори навколишнього середовища, що дозволяє запропонувати нативні продукти життєдіяльності пробіотиків для створення лікувально-профілактичних протимікробних препаратів і додаткових до антибіотиків «препаратів супроводження» та запропонувати оптимальні шляхи їхнього застосування для ерадикації антибіотикорезистентних збудників бактерійних інфекцій на різних стадіях інфекційного процесу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично й експериментально обґрунтовано нову стратегію розробки та застосування нативних метаболітних комплексів на основі ультразвукових дезінтегратів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745. Підґрунтям нового напряму подолання важких запальних процесів, обумовлених антибіотикорезистентними бактеріями в планктонній і біоплівковій формах, стало використання біологічно активних речовин пробіотичних штамів мікроорганізмів з вираженими поліфункціональними властивостями, зокрема протимікробними, антиадгезивними, протибіоплівковими, а також комбінованою активністю з антибіотиками.

1. Розроблено новий спосіб отримання нативних біологічно активних речовин на основі ультразвукових дезінтегратів пробіотичних штамів мікроорганізмів, які мають виражені протимікробні властивості відносно широкого спектру мікроорганізмів і не потребують додаткової очистки й модифікації. Найбільшою протимікробною активністю серед метаболітних комплексів від різних продуцентів *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *E. faecium*, *S. boulardii*, за традиційним та авторським способами отримання, володіли продукти життєдіяльності *L. rhamnosus* GG ATCC 53103. Посилено пригнічуючу дію проти патогенних коринебактерій, в 2,4 раза, завдяки спільному вирощуванню *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 в ультразвукових дезінтегратах пробіотичних штамів лактобактерій.

2. Встановлено біохімічний склад (білки 35 – 67 %, переважно пептиди з молекулярними масами ~ 4,2 – 5,7 кДа і ~ 1,1 кДа, амінокислоти, молочна кислота 19 – 62 %, вуглеводи, ліпіди 0,34 – 1,27 %, тейхоєві кислоти

1 – 7 % та мінеральні речовини – магній, цинк, мідь) й доведено безпечність у токсикологічних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* ультразвукових дезінтегратів і метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745.

3. Показана ефективність 2 – 24-годинної інкубації в біологічно активних речовинах *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 щодо пригнічення гемолітичної, лецитовітелазної активностей, продукування пігментів (піоціаніну, піовердину, піорубіну) *P. aeruginosa* № 139, *P. aeruginosa* № 13, *P. aeruginosa* № 14, *S. aureus* № 7, *S. haemoliticus* № 1, *S. haemoliticus* № 2, *C. d. mitis* tox +№ 167.

4. Встановлено високий рівень протимікробної активності ML та MLS щодо референтних штамів мікроорганізмів. МІК MLS для *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 становила 0,21 мг/мл за загальним білком, ML для *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 – 0,27 мг/мл за загальним білком, а для *P. aeruginosa* ATCC 27853 – 0,14 мг/мл за загальним білком.

5. Максимальне зменшення адгезивної активності бактеріальних клітин еталонного штаму *S. aurues* ATCC 6538 P (209-P) за двома напрямами дослідження (при обробці стафілококу або еритроцитів людини) відбувалося під впливом ML та LS (на 11,03 – 17,19 %, $p < 0,05$). Вірогідне зниження оптичної густини всіх дослідних проб щодо утворення біоплівок різними мікроорганізмами (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PR № 13, *K. pneumoniae* PR № 179, *L. amnigena* PR № 284, *Corynebacterium* spp.) відбувалося в 2,1 – 5,6 раза і сформованих біоплівок: ML – в 2,2 раза, MLS – в 1,9 раза відносно контролю ($p < 0,05$). Найбільш виражену протибіоплівкову дію стосовно біоплівкоутворення патогенних коринебактерій (*C. d. gravis* tox+ № 108, *C.d. belfanti* tox+№ 147) проявила комбінація MLS.

6. Розроблено оригінальний спосіб підвищення протимікробних, антиадгезивних, протибіоплівкових властивостей нативних метаболітів за умов вирощування *S. boulardii* CNCM I-745 в ультразвукових дезінтегратах *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

7. Мінімальні інгібуючі концентрації метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 та *S. boulardii* CNCM I-745 відносно як планктонних, так і біоплівкових форм були однакові для антибіотикорезистентних штамів *L. amnigena* PR № 284, *C. xerosis* PR № 2635 (ML – ≤ 0,03 мг/мл білка, MLS – ≤ 0,02 мг/мл білка), *P. aeruginosa* PR № 0924 (ML – 0,27 мг/мл білка та MLS – 0,21 мг/мл білка), *E. faecalis* PR № 51 (ML – 0,27 мг/мл білка). Протимікробна активність вища для біоплівкових форм ніж для планктонних: MLS щодо *E. faecalis* PR № 51 (МІК – 0,21 мг/мл білка БІК – 0,41 мг/мл білка), *S. aureus* PR № 2818 (МІК – 0,41 мг/мл білка, БІК – 0,83 мг / мл), *K. pneumoniae* PR № 5055 (МІК – 0,21 мг/мл білка, БІК – 0,41 мг/мл білка), а також ML відносно *S. aureus* PR № 2818, *K. pneumoniae* PR № 5055 (МІК – 0,55 мг/мл білка, БІК – 1,1 мг/мл білка).

8. Встановлено підвищення комбінованої антибактеріальної активності біологічно активних речовин *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і

S. boulardii CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами у 88 % комбінацій з ML, 83 % – з MLS, 85 % – з MS, 73 % – з LS відносно різних видів бактерій *P. aeruginosa* PR № 1, *A. baumannii* PR № 18, *K. pneumoniae* PR № 5055, *L. amnigena* PR № 284, *S. aureus* PR № 2778, *S. haemoliticus* PR № 1520, *E. faecalis* PR № 87 *C. xerosis* PR № 365, *Corynebacterium* spp. tox +. Показано, що спільне застосування метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибіотиками спричиняло перехід мікроорганізмів з категорій «резистентний» або «помірно стійкий» в «чутливий»: *P. aeruginosa* PR № 35 (при комбінуванні амікацину з ML, MLS, MS), *E. faecalis* PR № 95 (ципрофлоксацин з ML), *L. amnigena* PR № 284 (ципрофлоксацин з ML, MLS, MS).

9. В експериментах *in vivo* на моделях ран шкіри мурчаків, інфікованих антибіотикорезистентним штамом *P. aeruginosa* PR № 0924, встановлено протимікробні властивості нативних метаболітів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 при окремому лікувальному і профілактично-лікувальному застосуванні. Показано прискорення загоєння ран, майже на три доби, при попередньому профілактичному нанесенні ML.

10. На моделях інфекційних ран у лабораторних тварин доведено ефективність комбінованого (одночасного / послідовного) з амікацином впливу комбінації метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745. Виявлено швидший перехід ран обох груп дослідних тварин (комбіноване нанесення MLS з амікацином) із фази запалення в фазу регенерації порівняно з інтактними мурчаками. При послідовному нанесенні MLS з амікацином відзначалося достовірне зменшення КУО та площі поверхні ран (в 1,8 та 5,0 раза відповідно) ніж при одночасному випробуванні ($p < 0,05$), що показує перевагу почергового нанесення на рани метаболітів потім антибіотиків на відміну від їхнього одночасного впливу. Пріоритетом послідовного застосування є можливість багаторазово проводити попередню обробку рани метаболітами.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Рекомендовано для доклінічних випробувань і подальшого впровадження в терапевтичну практику з профілактичною метою нативні біологічно активні речовини *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з вираженими поліфункціональними властивостями.

Для більш ефективного лікування щодо пріоритетних збудників хвороб рекомендовано спільне використання метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745 з антибактеріальними препаратами. При комплексному терапевтичному лікуванні метаболітами і антибактеріальними препаратами, як більш ефективне, рекомендовано їхне послідовне застосування.

Пропонується впровадження на виробничі підприємства запропонованих способів одержання метаболітних комплексів на основі ультразвукових дезінтегратів з метою випуску ряду профілактично-лікувальних препаратів метаболітного типу, які при спільному використанні зі стандартними схемами

терапії, суттєво покращать результативність лікування пацієнтів з інфекційними хворобами, викликаними антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Isayenko O., Kotsar O. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of antibacterial drugs separately and together with metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* : monog. *Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine*. Riga: Baltija Publishing, 2020. С. 157–174. DOI:10.30525/ 978-9934-588-64-8-9 *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення результатів, написання розділу монографії).*
2. Isayenko O., Kotsar O., Ryzhkova T. Sensitivity of plankton and biofilm forms of antibiotic-resistant bacteria to metabolic complexes of lactobacteria and sacharomicets : monog. *Scientific basis of modern medicine*. Boston (USA): Primedia eLaunch, 2020. С. 98–104. https://isg-konf.com/wp-content/uploads/2020/05/Project-ISG-2020-MONO-MED-I.pdf *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання розділу монографії).*
3. Вплив умов зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків на їхню протимікробну активність / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Компанієць А. М., Осецький О., Полянська В. П., Зачепило С. В. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2017. Вип. 27 (4). С. 311–321. http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/138380. ***Scopus (Q3).*** *(проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, участь у написанні статті).*
4. Ісаєнко О. Ю. Збереження протимікробної активності метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii*. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020. Т. 30, № 4. С. 343–358. https://doi.org/10.15407/cryo30.04.343. ***Scopus (Q3).***
5. Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria / Isayenko O., Knysh O., Babych Y., Ryzhkova T., Dyukareva G. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10, №1. P. 3–8. DOI: 10.15421/021901. ***Web of Science.*** *(аналіз літературних джерел, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*
6. Evaluation of anti-microbial activity of filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* against antibiotic-resistant gram-negative bacteria / Isayenko O., Knysh O., Kotsar O., Ryzhkova T., Dyukareva G. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10, №. 2. P. 246–251. DOI: 10.15421/021937. ***Web of Science.*** *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

7. Isayenko O. Synergistic activity of filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* and antibacterial preparations against *Corynebacterium* spp. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10, №. 4. P. 445–456. https://doi.org/10.15421/021966. ***Web of Science***.

8. Simultaneous and sequential influence of metabolite complexes of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* and antibiotics against poly-resistant Gram-negative bacteria / Isayenko O. Y., Knysh O. V., Kotsar O. V., Ryzhkova T. N., Dyukareva G. I. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 139–145. https://doi.org/10.15421/022021. ***Web of Science***. *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

9. Протимікробна активність структурно–метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii* щодо *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 / Ісаєнко О. Ю., Коцар О. В., Рижкова Т. М., Бабич. Є. М. *Zaporozhye medical journal*. 2020. Т. 22, № 4. С. 540–546. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.4.208396. ***Web of Science.*** *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

10. Antibiofilm activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* metabolites in relation to polyresistant gram-negative microorganisms / Isayenko O. Y., Knysh O. V., Ryzhkova T. N., Kotsar O. V., Dyukareva G. I. *World of medicine and biology*. 2020. Vol. 72, № 2. P. 160–165. DOI: 10.26724/2079-8334-2020-2-72-160-165. ***Web of Science***. *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

11. Sensitivity of antibiotic-resistant microorganisms to metabolites of lactobacteria and combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* metabolites / Isayenko O. Y., Popov N. N., Ryzhkova T. N., Kotsar O. V., Dyukareva G. I. *World of medicine and biology*. 2020. Vol. 74, № 4. P. 227–232. doi.org/10.26724/2079-8334-2020-4-74-227-232. ***Web of Science.*** *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

12. Комбінований вплив метаболітного комплексу *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* та амікацину на інфіковані рани в моделях *in vivo* / Ісаєнко О. Ю., Мінухін В. В., Рижкова Т. М., Коцар О. В. *Zaporozhye medical journal*. 2020. Т. 22, № 6 (123). С. 791–798. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.6.218447. ***Web of Science.*** *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

13. Отримання метаболітних комплексів пробіотичних мікроорганізмів з вираженими антибактеріальними властивостями / Ісаєнко О. Ю., Коцар О. В., Рижкова Т. М., Дюкарева Г. І. *Zaporozhye medical journal*. 2021. Т. 23, № 1 (124). С. 120–125. https://doi.org/10.14739/2310-1210.2021.1.224923. ***Web of Science.***

(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).

14. Протимікробна активність продуктів метаболізму *Saccharomyces boulardii* відносно тест-культур стафілококів і коринебактерій / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Зачепило С .В., Савінова О. М., Набойченко О. А. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. Т.54, № 3. С. 50–55. *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів).*

15. Вплив продуктів метаболізму *Lactobacillus rhamnosus* GG на тест-культури стафілококів та коринебактерій / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Ківва Ф. В., Балак О. К., Набойченко О. А. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 2, № 136. С. 246–251. *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів).*

16. Цитотоксичність структурно-метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Фалько О. В., Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С. *Фізіологічний журнал*. 2019. Вип. 65, Т. 5. С. 40–48. URL: https://fz.kiev.ua/journals/2019_V.65/2019-5/5-2019-40-48.pdf *(аналіз літературних джерел, аналіз та узагальнення результатів, участь у написанні та редагуванні статті).*

17. Ісаєнко О. Ю. Протидифтерійні властивості структурно-метаболітних комплексів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів у тестах *in vitro* та *in vivo*. *Фізіологічний журнал*. 2019. Вип. 65, Т. 6. С. 51–60. https://fz.kiev.ua/journals/2019_V.65/2019-6/6-2019-51-60.pdf

18. Ісаєнко О. Ю. Токсикологічні дослідження структурно-метаболітних комплексів пробіотичних штамів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* в тестах *in vivo*. *Фізіологічний журнал*. 2020. Вип. 66, Т. 1. С. 60–67. https://fz.kiev.ua/journals/2020_V.66/60-67.pdf

19. Антиадгезивні властивості метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* в тестах *in vitro* / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Мінухін В. В., Рижкова Т. М., Дюкарева Г. І. *Український журнал медицини, біології та спорту.* 2020. Т. 5, № 3 (25). С. 282–289. https://doi.org/10.26693/jmbs05.03.282. *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

20. Склад фільтратів дезінтегратів та метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii.* / Ісаєнко О. Ю., Бабич Є. М., Мартинов А. В., Горбач Т. В., Антушева Т. І. *Вісник проблем біології і медицини.* 2020. Вип. 3, № 157. С. 204–207. DOI 10.29254/2077-4214-2020-3-157-204-207 *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, участь у проведенні експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

21. Гель-хроматографічне фракціонування метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* та їх протимікробна

активність / Ісаєнко О. Ю., Бабич Є. М., Горбач Т. В., Семенченко О. Ю., Коцар О. В. *Український журнал медицини, біології та спорту.* 2020. Т. 5, № 4 (26). С. 240–247. DOI: 10.26693/jmbs05.04.240 *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

22. Теоретичне обгрунтування перспективності застосування метаболітних комплексів лактобактерій та сахароміцетів щодо боротьби з антибіотикорезистентністю мікроорганізмів / Ісаєнко О. Ю., Бабич Є. М., Горбач Т. В., Півненко С. Ю., Антушева Т. О. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2020. № 4. С. 63–69. DOI: 10.5281/zenodo.4382213 *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).*

23. Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій : пат. 123122 Україна. u 2017 08821 / О. Ю. Ісаєнко, О. В. Книш, Є. М. Бабич, В. П. Полянська, С. В. Зачепило, В. Л. Ващенко, О. І. Коваленко, О. К. Балак. ; заявл. 04.09.17 ; опубл. 12.02.18, Бюл. № 3. 4 с. (*ідея розробки способу одержання нативних речовин, аналіз наукової патентної літератури, планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, участь в оформленні заявки на винахід).*

24. Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій: пат. 126603 Україна. u 2018 01032 / О. Ю. Ісаєнко, О. В. Книш, Є. М. Бабич, Ф. В. Ківва, Т. В. Горбач, О. К. Балак. ; заявл. 02.05.18 ; опубл. 25.06.18, Бюл. № 9. 4 с. (*ідея розробки способу одержання комбінації нативних речовин, аналіз наукової патентної літератури, планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, участь в оформленні заявки на винахід).*

25. Спосіб одержання метаболітів пробіотичних штамів бактерій : [нововвед.] / О. Ю. Ісаєнко, О. В. Книш, Є. М. Бабич, В. П. Полянська, С. В. Зачепило, В. Л. Ващенко, О. І. Коваленко, О. К. Балак. *Інформаційний бюлетень НАМН України. Додаток до Журналу Національної академії медичних наук України*. К., 2019. Вип. 47. С. 56. *(ідея розробки способу одержання нативних речовин, проведення експериментальних досліджень, підготовка до опублікування галузевого нововведення).*

26. Спосіб одержання комбінації метаболітів пробіотичних штамів грибів і бактерій : [нововвед.] / О. Ю. Ісаєнко, О. В. Книш, Є. М. Бабич, Ф. В. Ківва, Т. В. Горбач, О. К. Балак. *Інформаційний бюлетень НАМН України. Додаток до Журналу Національної академії медичних наук України*. К., 2019. Вип. 47. С. 56–57. *(ідея розробки способу одержання комбінації нативних речовин, проведення експериментальних досліджень, підготовка до опублікування галузевого нововведення).*

27. Антибактериальные свойства дезинтегратов *L. rhamnosus* GG по отношению к представителям рода *Corynebacterium* / Исаенко Е. Ю., Кныш О. В., Бабич Е. М., Антушева Т. И., Балак А. К., Набойченко Е. А. Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція : тези

допов. І науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю (18 жовтня 2018 р.). Х. : Вид-во НФаУ, 2018. С. 104–105. *(аналіз літературних джерел, планування експерименту, проведення експериментальних досліджень, аналіз, узагальнення результатів, написання тез).*

28. Чувствительность некоторых представителей энтеробактерий к продуктам метаболизма лактобактерий / Исаенко Е. Ю., Кныш О. В., Бабич Е. М., Набойченко Е. А., Балак А. К. Экстренная и неотложная медицинская помощь – XXI век : тезисы доклада Всероссийской научно-практической конференции. Барнаул (20 апреля 2017 г.). Изд-во ИПП «Алтай», 2017. С. 169 – 170. *(аналіз літературних джерел, планування, проведення експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення результатів, написання тез).*

29. Влияние продуктов метаболизма лактобактерий на жизнеспособность *Pseudomonas aeruginosa.* / Исаенко Е. Ю., Кныш О. В., Бабич Е. М., Набойченко Е. А., Балак А. К. XX Кашкинские чтения : тезисы доклада Российско-китайского конгресса по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии. Проблемы медицинской микологии (14 – 16 июня 2017 г.). Санкт-Петербург, 2017. Т. 19, № 2. С. 71. *(аналіз літературних джерел, планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз, узагальнення результатів, написання тез).*

30. Протистафілококова активність метаболітів лактобактерій. Матеріали І Міжнародної науково-практичної конференції / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Савінова О. М., Балак О. К., Набойченко О. А. Ліки - людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів : тези доп. І міжнар. науково-практичної конференції (30 – 31 березня 2017 р.). Х. : Вид-во НФаУ, 2017. С. 152–153. *(аналіз літературних джерел, планування, проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання тез).*

31. Підвищення чутливості полірезистентного штаму *Lelliottia amnigena (Enterobacter amnigenus)* фільтратами *Lactobacillus rhamnosus* і *Saccharomyces boulardii* до хінолонів та пеніцилінів / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Набойченко О. А., Науменко Т. Ю., Шевченко О. І., Козко І. П., Курило Н. Є., Балак О. К. Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації : тези доп. І міжнар. науково-практичної конференції (15 травня 2019 р.). Х., 2019. С. 86–87. *(аналіз літературних джерел, планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз і узагальнення результатів, написання тез).*

32. Збільшення чутливості резистентного мікроорганізму *Lelliottia amnigena (Enterobacter amnigenus)* структурно-метаболітними комплексами *Lactobacillus rhamnosus* і *Saccharomyces boulardii* до антибактеріальних препаратів / Ісаєнко О. Ю., Книш О. В., Бабич Є. М., Набойченко О. А., Науменко Т. Ю., Шевченко О. І., Козко І. П., Курило Н. Є., Балак О. К. Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів : тези доп. міжнар. науково-практичної конференції (16-17 травня 2019 р.). *Імунологія та алергологія. Додаток № 1.* 2019. С 143–144. *(аналіз літературних джерел,*

планування, проведення експериментальних досліджень, аналіз, узагальнення результатів, написання тез).

33. Чутливість*Staphylococcus* до метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. Boulardii* / Ісаєнко О. Ю., Кучугура Ю. В., Книш О. В., Бабич Є. М., Набойченко О. А., Науменко Т. Ю., Козко І. П., Шевченко О. І., Курило Н. Є. Сучасна медицина очима молоді: проблеми і перспективи вирішення : тези доп. міжнар. науково-практичної конференції (22 травня 2020 р.). Х., 2020. С. 15. *(аналіз літературних джерел, планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання тез).*

34. Ісаєнко О. Ю Вивчення безпечності структурних компонентів і метаболітних сполук пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині : тези доп. міжнар. науково-практичної конференції (19 березня 2020 р.). Х. : НФаУ, 2020. С. 39. *(аналіз літературних джерел, узагальнення результатів, написання тез).*

35. Ісаєнко О. Ю. Дослідження цитотоксичності метаболітітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii* на ембріональних фібробластах і спленоцитах миші. Ліки - людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів паразитологів : тези доп. IV міжнар. науково-практичної конференції (12–13 березня 2020 р.). Х., 2020. С. 280–281. *(аналіз літературних джерел, узагальнення результатів, написання тез).*

АНОТАЦІЯ

Ісаєнко О. Ю. Мікробіологічне обґрунтування нової стратегії розробки та застосування нативних метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* для подолання антибіотикорезистентних збудників бактерійних інфекцій – *На правах рукопису.*

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Державна установа «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України». Харків, 2021.

У дисертаційній роботі представлене обґрунтування нової стратегії розробки нативних метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745, отриманих на основі ультразвукових дезінтегратів пробіотичних штамів мікроорганізмів, та застосування їх окремо й у комбінації з антибактеріальними препаратами. Метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 і *S. boulardii* CNCM I-745, які не потребують додаткової очистки і модифікації, проявили виражені поліфункціональні властивості, а саме: протимікробні, антиадгезивні, протибіоплівкові, комбінований ефект з антибіотиками, підвищення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. За умов випробувань *in vitro* та *in vivo* показано перевагу послідовного впливу продуктів життєдіяльності з антибактеріальними

препаратами перед одночасним їхнім застосуванням відносно патогенних і антибіотикорезистентних умовно-патогенних бактерій. Встановлена ефективність терапевтичного та профілактичного використання біологічно активних речовин в моделях *in vivo.* Експериментально доведено й теоретично обґрунтовано оптимальне застосування нативних речовин для подолання важких запальних процесів, спричинених антибіотикорезистентними бактеріями в планктонній і біоплівковій формах.

Ключові слова: нативні метаболітні комплекси, антибіотикорезистентність, ультразвукові дезінтеграти, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *S. boulardii* CNCM I-745, протибіоплівкові властивості, комбінація з антибіотиками, протимікробна активність, послідовне застосування, одночасне застосування.

АННОТАЦИЯ

Исаенко Е. Ю. Микробиологическое обоснование новой стратегии разработки и применения нативных метаболитных комплексов *Lactobacillus rhamnosus* GG и *Saccharomyces boulardii* для преодоления антибиотикорезистентных возбудителей бактериальных инфекций - *На правах рукописи.*

Диссертация на соискание научной степени доктора медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины». Харьков, 2021.

В диссертационной работе представлено обоснование новой стратегии разработки нативных метаболитных комплексов *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 и *S. boulardii* CNCM I-745, полученных на основе ультразвуковых дезинтегратов пробиотических штаммов микроорганизмов, и применения их отдельно и в комбинации с антибактериальными препаратами. Метаболитные комплексы *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 и *S. boulardii* CNCM I-745, которые не нуждаются в дополнительной очистки и модификации, проявили выраженные полифункциональные свойства, а именно: противомикробные, антиадгезивные, противобиопленочные, комбинированный эффект с антибиотиками, повышение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. В условиях испытаний *in vitro* и *in vivo* показано преимущество последовательного воздействия продуктов жизнедеятельности с антибактериальными препаратами перед одновременным их применением в отношении патогенных и антибиотикорезистентных условно-патогенных бактерий. Установлена эффективность терапевтического и профилактического использования биологически активных веществ в моделях *in vivo*. Экспериментально доказано и теоретически обосновано оптимальное применение нативных веществ для преодоления тяжелых воспалительных процессов, вызванных антибиотикорезистентными бактериями в планктонных и биопленочных формах.

Ключевые слова: нативные метаболитные комплексы, антибиотикорезистентность, ультразвуковые дезинтеграты, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *S. boulardii* CNCM I-745, противобиопленочные свойства,

комбинация с антибиотиками, противомикробная активность, последовательное применение, одновременное применение.

SUMMARY

Isayenko O.Y. Microbiological justification of a new strategy for the development and application of native metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* to overcome antibiotic-resistant pathogens of bacterial infections – *On the rights of the manuscript.*

Thesis for a Doctor's of Medicine degree in speciality 03.00.07 – Microbiology. – State Institution «I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, 2021.

The work is devoted to the development of new methods for obtaining metabolic complexes of *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 and *S. boulardii* CNCM I-745 and proposing the optimal use of these substances alone and in conjunction with antibiotics. Antimicrobial, antibiofilm, antibiotic-combined characteristies and in vivo efficiency have been investigated.

Based ultrasonic disintegrants of probiotic microorganisms, which were used as nutrient media for increasing the microbial mass of producers, native metabolic complexes *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 were received with significant multifunctional properties that do not require additional purification and modification, which became the basis of a new strategy for the development of native substances. Increasing the antimicrobial properties against pathogenic corynebacteria was achieved by co-cultivation *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 and *S. boulardii* CNCM I-745 in ultrasonic disintegrates of probiotic lactobacilli. Higher antimicrobial, antiadhesive, antifilm activity against pathogenic and antibiotic-resistant opportunistic bacteria had products of life *S. boulardii* CNCM I-745, obtained on the basis of ultrasonic disintegrates *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 than in their own disintegrates. The substances thus obtained contained cellular structures of probiotic lactobacilli and metabolites of probiotic saccharomycetes, which made it possible to show complementary actions of prokaryotic and eukaryotic derivatives.

Native metabolic complexes of *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 and *S. boulardii* CNCM I-745 found a combined effect with antibiotics. At simultaneous use increase of the combined antimicrobic activity was observed. This effect is probably due to the high level of antimicrobial and antibiofilm activity of probiotics in low concentrations. The minimum inhibitory concentrations of metabolic complexes of *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 and *S. boulardii* CNCM I-745 relatively to both planktonic and biofilm forms were the same for antibiotic-resistant strains of *L. amnigena* PR № 284, *C. xerosis* PR № 2635 (ML – ≤ 0,03 mg/ml protein, MLS – ≤ 0,02 mg/ml protein), *P. aeruginosa* PR № 0924 (ML – 0,27 mg/ml protein and MLS – 0,21 mg/ml protein), *E. faecalis* PR № 51 (ML – 0,27 mg/ml protein). Antimicrobial activity is higher for biofilm forms than for planktonic: MLS against *E. faecalis* PR № 51 (MIC – 0.21 mg/ml protein BIC – 0.41 mg/ml protein), *S. aureus* PR № 2818 (MIC – 0,41 mg/ml protein, BIC – 0.83 mg/ml), *K. pneumoniae* PR № 5055 (MIC – 0,21 mg/ml protein, BIC – 0,41 mg/ml protein), and ML relative to *S. aureus* PR № 2818, *K. pneumoniae* PR № 5055 (MIC – 0,55

mg/ml protein, BIC – 1,1 mg/ml protein). This indicates the advantage of metabolic complexes of *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 and *S. boulardii* CNCM I-745 over antibacterial drugs, which are ineffective in combating biofilm forms of pathogens.

In vitro and in vivo tests have shown the advantage of sequential exposure of products of life with antibacterial drugs, which involves their alternate use, before simultaneons use. This effect can be explained by the increased sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs due to the previous exposure of metabolic complexes relative to the inhibition of certain signs and factors of bacterial pathogenicity: hemolytic (*S. aureus* № 7, *S. haemoliticus* № 1, *S. haemoliticus* № 2, *C. d. mitis* to*x* +№ 167, *P. aeruginosa*) lecithovitelase (*S. aureus* № 7) activities, pigments pyocyanin, pyoverdine, pyorubin (*P. aeruginosa* № 139, *P. aeruginosa* № 13, *P. aeruginosa* № 14).

Antimicrobial properties of metabolic complexes *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 i *S. boulardii* CNCM I-745 confirmed in the model of infectious wounds in ginea pigs (therapeutic use) and (preventive and curative use): acceleration of wound healing for almost three days occurred during the previous preventive application against intact animals. In the model of in vivo infected wounds of the skin of ginea pigs simultaneous and sequential use of the metabolic complex *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 i *S. boulardii* CNCM I-745 with amikacin contributed to the faster eradication of the antibiotic-resistant pathogen *P. aeruginosa*.

The optimal ways of independent use of native substances for overcoming severe inflammatory processes caused by antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms are substantiated, when it is impossible to use antibacterial drugs, as well as to prevent the development of nosocomial and chronic pathological infectious processes and combined use with antibiotics to reduce the duration of treatment of priority antibiotic-resistant pathogens of bacterial infections.

Key words: native metabolic complexes, antibiotic resistance, ultrasonic disintegrates, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *S. boulardii* CNCM I-745, antibiofilm properties, combinations with antibiotics, antimicrobial activity, sequential use, simultaneous use.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

EL_p	метаболітні комплекси *L. plantarum* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента в ультразвукових дезінтеграторах *E. faecium*
ML	метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG із середовищ культивування мікробних клітин продуцента у власних ультразвукових дезінтеграторах
ML (Б)	метаболіти *L. rhamnosus*, отримані культивуванням продуцента в поживному бульйоні з додаванням 1 % глюкози
MLS	комбінація метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* із середовищ культивування мікробних клітин продуцентів в ультразвукових дезінтеграторах *L. rhamnosus*
MLS(Б)	метаболіти *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, отримані культивуванням продуцентів в поживному бульйоні з додаванням 1 % глюкози
ML_p	метаболітні комплекси *L. plantarum* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента у власних ультразвукових дезінтеграторах
MS	метаболітні комплекси *S. boulardii* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента у власних ультразвукових дезінтеграторах
MS (Б)	метаболіти *S. boulardii*, отримані культивуванням продуцента в поживному бульйоні з додаванням 1 % глюкози
L	клітинні структури (фільтрат ультразвукового дезінтеграту) *L. rhamnosus* GG
lg	десятковий логарифм
L_rL_p	метаболітні комплекси *L. plantarum* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента в ультразвукових дезінтеграторах *L. rhamnosus* GG
L_rE	метаболітні комплекси *E. faecium* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента в ультразвукових дезінтеграторах *L. rhamnosus* GG
LS	метаболітні комплекси *S. boulardii* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента в ультразвукових дезінтеграторах *L. rhamnosus* GG
L_p	клітинні структури (фільтрат ультразвукового дезінтеграту) *L. plantarum*
L_pE	метаболітні комплекси *E. faecium* із середовищ культивування мікробних клітин продуцента в ультразвукових дезінтеграторах *L. plantarum*
PR	антибіотикорезистентні ізоляти
S	клітинні структури (фільтрат ультразвукового дезінтеграту) *S. boulardii*
A	амікацин / аміцил
АБ	антибактеріальні препарати

БАР	біологічно активні речовини
БІК	мінімальна інгібуюча (пригнічуюча) концентрація відносно біоплівкових форм бактерій
Е	клітинні структури (фільтрат ультразвукового дезінтеграту) *E. faecium*
ЗПР	загальна площа рани
КС	мікробні / клітинні структури
КУО	кількість життєздатних клітин мікроорганізмів
Л	лікувальне застосування
МБцК	мінімальна бактерицидна концентрація
МІК	мінімальна інгібуюча (пригнічуюча) концентрація
МК	структурно-метаболітні комплекси
НК	негативний контроль
П	профілактичне та лікувальне застосування
ПК	позитивний контроль
ТСБ	триптиказо-соєвий бульйон
ум. од.	умовні одиниці
ФР	0,9 % розчин натрію хлориду
Ц	ципрофлоксацин
ШЗ	швидкість загоєння