

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

**КАЛІНІЧЕНКО СВІТЛАНА ВІКТОРІВНА**

УДК: 579.864.1:616-097:579.61.2:616-092(043.3)

**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ НОВИХ ПІДХОДІВ ДО  
ПОДОЛАННЯ СТАФІЛОКОКОВОГО НОСІЙСТВА ЗА ДОПОМОГОЮ  
ЛАКТОБАЦИЛ ТА ПОВЕРХНЕВИХ МІКРОБНИХ АНТИГЕНІВ**

03.00.07- мікробіологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора медичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»

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

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

**Офіційний опонент:** доктор медичних наук, професор **Кременчуцький Геннадій Миколайович**, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», професор кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології;

**Офіційний опонент:** доктор медичних наук, професор **Коваль Галина Миколаївна**, ДВНЗ «Ужгородський національний університет» МОН України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та епідеміології з курсом інфекційних хвороб.

Захист відбудеться « 11 » березня 2021 р. об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

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

Автореферат розісланий « 09 » лютого 2021 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01,  
кандидат медичних наук



І. А. Воронкіна

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Запальні захворювання верхніх дихальних шляхів за поширеністю посідають перше місце в структурі патології ЛОР-органів людини, причому вельми актуальними нозокоміальними інфекціями верхніх дихальних шляхів (ВДШ) є інфекції стафілококового генезу (Sakr A. et al., 2018; Accorsi E. K. et al., 2020). Найбільш поширеним джерелом *Staphylococcus aureus* є практично здорові носії серед медичних, педагогічних і фармацевтичних працівників та інших верств населення. Відомо, що при бактеріоносійстві відбувається перебудова механізмів захисту макроорганізму з формуванням імунологічного дисбалансу (Hanssen A.-M. et al., 2017; Lamanna O. et al., 2017).

Традиційні методи санації бактеріоносіїв за допомогою антибактеріальних препаратів є малоефективними – носійство з часом відновлюється та потребує повторних курсів лікування, а застосування повторних курсів антибіотикотерапії призводить до ще більшого пригнічення функціонування імунної системи носія та формування антибіотикорезистентності у штамів мікроорганізмів (Ruddaraju L. K. et al., 2020). Одним із стратегічних напрямів боротьби з антибіотикорезистентністю ВООЗ вважає поступове заміщення антибіотиків на профілактичні засоби нових поколінь (WHO, 2020). Крім того, що нераціональна антибіотикотерапія сприяє формуванню резистентності мікроорганізмів, вона призводить і до мікроекологічних порушень. Зазначене обумовлює напрям наукових досліджень щодо визначення шляхів нормалізації мікрофлори ВДШ. Пошукові дослідження останніх років дозволяють зробити припущення про можливість використання певних пробіотичних штамів, як регуляторів мікробіоценозів при інфекціях верхніх дихальних шляхів (Laursen R. P. et al., 2018; Lehtoranta L. et al., 2020).

Для колонізації будь-якої екологічної ніші макроорганізму бактерії використовують поверхневі молекулярні структури. Інфекційний процес розпочинається після адгезії та колонізації мікроорганізмами мукозальної поверхні слизових оболонок. Отже, за впливу на патогенні бактерії в початковій стадії колонізації макроорганізму (пригнічення адгезії бактерій) можна пригнічувати й розвиток інфекційного процесу. Зазначене формує основу антиадгезивної стратегії розробки імунобіологічних препаратів нового покоління.

У розробці імунобіологічних препаратів нового класу науковці пропонують використовувати саме такі патоген-асоційовані молекулярні структури (ПАМС), оскільки вони запускають механізми вродженого й адаптивного імунітету, блокують поверхневі епітопи, що перешкоджає адгезії бактерій і, таким чином, сприяють попередженню розвитку інфекції (Єлисеєва І. В. та ін., 2019). Для блокування відповідних рецепторів на слизових оболонках носової порожнини можуть бути застосовані нативні поверхневі мікробні антигени.

Отримання нативних поверхневих антигенів за допомогою фізичних чинників надає можливість не застосовувати хімічні речовини, які можуть негативно впливати на організм людини (Єлисеєва І. В., 2020). До того ж застосування фізичних чинників сприятиме стандартизації процесу отримання

поверхневих нативних структур, що, в свою чергу, знижуватиме токсичність і реактогенність імунобіологічних препаратів (Yelyseyeva I. та ін., 2018).

Поєднання цих двох стратегій надає можливість розробки імунобіологічних препаратів нового покоління, які, з одного боку, будуть пригнічувати колонізаційні й персистентні властивості патогенів, а з іншого, будуть стимулювати протиінфекційну резистентність слизових оболонок.

Концепція представленої роботи полягає в поєднанні пробіотиків та/або їх біологічно активних сполук з нативними поверхневими антигенами *S. aureus*, що надасть можливість, з одного боку – блокувати рецептори для прикріплення *S. aureus* до епітеліальних клітин, а з іншого – стимулювати місцеві ланки імунітету.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фрагментом трьох завершених науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (ДУ ІМІ НАМН): «Застосування електромагнітних полів (ЕМП) для посилення утворення окремих метаболітів та підвищення стабільності біологічних властивостей їх продуцентів» (№ держреєстрації 0107U001639); «Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль» (№ держреєстрації 0113U001517) та «Вивчення біологічних та фізико-хімічних передумов розробки протидифтерійних засобів на основі метаболітів пробіотичних штамів» (№ держреєстрації 0116U000864). Здобувач був відповідальним виконавцем зазначених тем, проводив аналіз світової наукової літератури, планував та брав безпосередню участь в експериментальних дослідженнях, проводив їх облік, аналіз і статистичну оцінку, робив висновки, узагальнював отримані результати, писав відповідні праці.

**Мета і завдання дослідження.** *Мета* – теоретично і експериментально обґрунтувати нові підходи для підвищення ефективності профілактики і боротьби зі стафілококовим носійством шляхом зниження персистенції *S. aureus* на слизових оболонках за рахунок антагоністичних властивостей *Lactobacillus* spp. та блокування адгезивних процесів нативними поверхневими антигенами збудника.

**Завдання дослідження:**

1. Визначити видовий склад представників мікробіоценозів ВДШ та популяційний рівень *S. aureus* і *Lactobacillus* spp. у носіїв *S. aureus* (ICD 10, Z 22.3) серед медичного персоналу, хворих на хронічний риніт (J 31, XP), хронічний синусит (J 32, XC) і тонзиліт (J 35.0, XT) та вивчити їх біологічні властивості за різних умов газового складу атмосфери інкубування.

2. Дослідити вплив екзо- (дифтерійний токсин) та ендотоксинів (ліпополісахарид *Escherichia coli* 126), як індукторів антагоністичних міжмікробних взаємовідносин на біологічні властивості окремих представників грамнегативних (*E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, клінічний ізолят *Klebsiella pneumoniae*) і грампозитивних бактерій (*S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 6783).

3. Вивчити антагоністичні властивості різних представників *Lactobacillus* відносно патобіонтів ВДШ, що спричиняють бактеріоносійство – бактерій родів *Staphylococcus* і *Corynebacterium*.

4. Проаналізувати зміни біологічних властивостей представників *Lactobacillus* за умов різного газового складу атмосфери їх інкубації.

5. Провести мікробіологічний скринінг ізолятів *Lactobacillus* spp. та відібрати найбільш перспективні щодо використання для корекції мікробіоценозів ВДШ.

6. Охарактеризувати метаболітні комплекси, що продукують *Lactobacillus* spp., отримані за різних умов газового складу атмосфери інкубації штамів-продуцентів.

7. Вивчити вплив електромагнітних і ультразвукових хвиль на адгезивні властивості мікроорганізмів та визначити оптимальні режими опромінення для отримання поверхневих антигенів *S. aureus*.

8. За допомогою фізичних чинників отримати експериментальні зразки, що містять нативні поверхневі антигени *S. aureus* та вивчити їх антиадгезивні й імунобіологічні властивості.

9. Розробити лабораторні моделі хронічного тонзиліту (ХТ) і хронічного риніту (ХР) стафілококового генезу на лабораторних тваринах.

10. На моделях ХТ і ХР у лабораторних тварин визначити дози та схеми введення отриманих експериментальних зразків поверхневих мікробних антигенів, які перешкоджатимуть колонізації *S. aureus* слизових оболонок носової порожнини, що планується використовувати як компонент кандидат-вакцини.

11. Оцінити ефективність комплексного застосування мукозальної кандидат-вакцини на основі нативних поверхневих антигенів *S. aureus* і відібраних представників *Lactobacillus* на лабораторній моделі ХР.

**Об'єкт дослідження:** пробіотичні і клінічні штами *Lactobacillus* spp.; референтні штами та клінічні ізоляти умовно-патогенних і патогенних бактерій; метаболіти *Lactobacillus* spp., експериментальні зразки нативних поверхневих антигенів *S. aureus*.

**Предмет дослідження:** біологічні властивості штамів *S. aureus* і *Lactobacillus* spp. за умов різного газового складу атмосфери їх інкубації; безклітинні супернатанти (БС або метаболіти) представників *Lactobacillus* spp.; безклітинні антигенні комплекси (БА або антиантиадгезини) з дезінтегрантів *S. aureus*; біохімічний склад, цитотоксичні, токсичні, бактеріотропні (здатність впливати на ріст, адгезію і біоплівкоутворення патобіонтів) і імунотропні (здатність впливати на популяційний склад біоценозів та протиінфекційну резистентність слизових оболонок верхніх дихальних шляхів) властивості БС і БА.

**Методи дослідження:** загально-клінічні (аналіз скарг хворих, даних анамнезу хвороби, результатів клінічного обстеження та особливостей перебігу хронічних тонзилітів, ринітів і синуситів); мікроскопічні (дослідження морфологічних і тінкторіальних властивостей бактерій); бактеріологічні (вивчення видового складу представників мікробіоценозів ВДШ та

популяційного рівню *S. aureus* і *Lactobacillus* spp., культивування пробіотичних бактерій та патобіонтів, вивчення їх біологічних властивостей (продукування факторів патогенності, адгезивні і антагоністичні властивості, підрахунок кількості життєздатних клітин (КУО/мл), аналіз і зіставлення ідентичності за результатами фаготипування та антибіотикочутливості клінічних штамів стафілококів); фізико-хімічні: спектрофотометричний метод (дослідження добового приросту біомаси та біоплівкоутворення індикаторних культур), рідинна гель-хроматографія (дослідження білкового складу БС і екзотоксину), хромато-мас-спектрометрія і електрофорез у поліакріламідному гелі (ДСН-ПААГ-електрофорез) (дослідження складу ЛПС); біохімічні (вивчення ферментування цукрів, складу БС і БА); імунологічні (визначення фагоцитарної та бактерицидної здатності нейтрофілів крові людини, рівнів секреторного імуноглобуліну А (sIgA) і лізоциму слизових оболонок ВДШ); імунобіологічні (вивчення цитотоксичності, токсичності, алергенності БС і БА *in vitro* та їх імуноотропних, інгібіторних властивостей щодо патобіонтів, ефектів БС і БА *in vivo* на моделях хронічного інфекційного процесу стафілококового генезу); молекулярно-генетичні (ідентифікація лактобацил за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з випадковою ампліфікацією поліморфної ДНК, англ. Random Amplification of Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction RAPD-PCR); аналітичні та медико-статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Показано, що існуюча стратегія ерадикації *S. aureus* не перешкоджає носійству *S. aureus* серед декретованих прошарків населення та сприяє розповсюдженню нозокоміальних інфекцій стафілококового генезу в лікувально-профілактичних закладах країни, дитячих колективах, закладах вищої освіти тощо. Для зниження персистенції *S. aureus* на слизових оболонках ВДШ вперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено кардинально новий підхід щодо удосконалення методів профілактики стафілококового бактеріоносійства. Запропоновано мукозальну кандидат-вакцину з антиадгезивним і пробіотичним компонентами.

Значно поглиблено рівень знань відносно популяційного рівня *Lactobacillus* spp. на слизових оболонках ВДШ за умов хронічної ЛОР-патології. Встановлено, що частота виділення представників роду *Lactobacillus* зі слизових оболонок зіву і носа у хворих з ЛОР-патологією та носіїв є значно нижче порівняно з показниками практично здорових осіб.

Розширено сучасні погляди на регуляторні реакції мікроорганізмів в залежності від змін умов оточуючого середовища. Доведено вплив дифтерійного екзотоксину і ліпополісахариду *E. coli* 126 та умов газового складу атмосфери інкубації на біологічні властивості (ростові, адгезивні і антикомплементарні) певних видів мікроорганізмів. За авторським способом вивчено здатність пробіотичної флори і патобіонтів до утилізації глюкози, що є показником потенційного розвитку субпопуляцій. Зазначене поглиблює рівень знань щодо міжмікробних взаємовідносин, які побудовані на антагоністичних і регуляторних властивостях асоціантів.

На основі авторського способу моделювання адгезивних властивостей мікроорганізмів вперше визначено оптимальний режим застосування двох

фізичних чинників (електромагнітних хвиль міліметрового діапазону і ультразвуку) для отримання поверхневих антигенів бактерій з антиколонізаційними властивостями та вперше одержано хімічно не змінені (нативні) поверхневі антигени *S. aureus*, як можливі платформи для створення нового класу неін'єкційних імунобіологічних препаратів.

Вперше вивчено біохімічний склад безклітинних супернатантів (БС) *Lactobacillus* spp. (Лас), отриманих за різних умов газового складу атмосфери культивування продуцентів та безклітинних антигенних комплексів (БА) *S. aureus*, отриманих за допомогою фізичних чинників, їх імунобіологічні властивості. За результатами проведеного *in vivo* імунобіологічного скринінгу вперше встановлено біологічну безпечність отриманих оригінальним способом БС і БА у тестах визначення загальнотоксичної та дерматонекротичної дії та можливість тривалого назального застосування за умови суворого дозування.

Вперше, на розроблених лабораторних моделях, показано, що експериментальні зразки БС і комплексів БС+БА або Лас+БА (мукозальна кандидат-вакцина) здатні регулювати біоценози слизових оболонок ВДШ при стафілококовому носійстві та відновлювати їхню протиінфекційну резистентність шляхом повної ерадикації *S. aureus*, підвищення популяційного рівня *Lactobacillus* spp., відновлення показників місцевого імунітету. На основі авторського способу моделювання стафілококового бактеріоносійства вперше показано корисну імунобіологічну дію (антиколонізаційну активність відносно золотистих стафілококів і здатність відновлювати протиінфекційну резистентність (рівні sIgA та лізоциму) слизових оболонок ВДШ) експериментальних препаратів шляхом тривалого моніторингу (90 діб) елімінації збудника зі слизових оболонок лабораторних тварин. Тобто, вперше доведено ефективність застосування інтраназальної форми для імунопрофілактики/лікування стафілококового бактеріоносійства з одночасним відновленням мікробіоценозу слизової оболонки та функціонування місцевих ланок імунної системи.

Вперше досліджено біологічні і молекулярно-генетичні властивості оригінального штаму *Lactobacillus plantarum* IMB B-7679, виділеного з кишечника бджіл. Встановлено безпечність зазначеного штаму та обґрунтовано його можливість використання як пробіотичного. Доведено високу антагоністичну здатність штаму *L. plantarum* IMB B-7679 відносно представників родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* і *Escherichia*. Корисні біологічні властивості штаму *L. plantarum* IMB B-7679 надають змогу віднести його до пробіотичних і рекомендувати для розробки нових вітчизняних імунобіологічних препаратів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Надано обґрунтування та одержано експериментальні зразки нативних поверхневих антигенів *S. aureus* із високою антиколонізаційною здатністю. Запропоновано і впроваджено в бактеріологічні лабораторії медичних закладів України метод для стандартизації приготування мікробних суспензій (Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006. Міністерство охорони здоров'я України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної

роботи). Запропоновано нові методи досліджень у галузі медичної мікробіології та отримано: патент України на винахід «Спосіб модуляції адгезивних властивостей мікроорганізмів», №79848; п'ять патентів України на корисну модель: «Поживне середовище для одночасного виявлення гемолітичної та лецитиназної активностей мікроорганізмів», №36224, «Спосіб визначення катаболічної активності мікроорганізмів», №74763, «Спосіб одержання моделі хронічного тонзиліту», №70957, «Спосіб одержання лабораторної моделі хронічного назального носійства стафілококового генезу у кролів», № 113116, «Композиція інгредієнтів фітобіотику VITUS-LACT», № 135936. Розроблено і впроваджено у вітчизняну медичну практику чотири галузеві нововведення: «Спосіб стандартизації приготування мікробних суспензій», «Спосіб модуляції адгезивних властивостей мікроорганізмів», «Спосіб одночасного виявлення гемолітичної та лецитиназної активностей мікроорганізмів», «Спосіб визначення катаболічної активності мікроорганізмів». Розроблено і видано методичні рекомендації полігалузевого значення: «Методи оцінки властивостей потенційних пробіотичних штамів лактобацил і біфідобактерій», «Методи пошуку перспективних штамів мікроорганізмів для розробки пробіотичних та метабіотичних препаратів». Основні матеріали й положення дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес і наукову роботу кафедри епідеміології Харківського національного медичного університету (3 акти впровадження від 18.02.2020 р., 10.03. 2020 р., 08.09.2020 р.), кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна (2 акти впровадження від 26.05.2020 р. та 09.06.2020), кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (акт впровадження від 04.09.2020 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом самостійно обрано напрям дослідження, сформульовано мету та визначено завдання дослідження. Автор особисто провів інформаційно-патентний пошук та аналіз літературних джерел щодо мікроекологічних аспектів стафілококової інфекції верхніх дихальних шляхів, застосування пробіотиків в лікуванні інфекцій ВДШ стафілококового генезу, ролі нормофлори в протиінфекційній резистентності слизових оболонок, сучасних напрямів створення, удосконалення та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів. Здобувач вибрав методи досліджень, самостійно проводив планування досліджень, складав плани і схеми експериментів. Здобувач самостійно провів мікробіологічні дослідження у хворих на ЛОР-патологію, вилучив та провів ідентифікацію клінічних штамів стафілококів і лактобацил, вивчив їх біологічні властивості, у тому числі за умов впливу біотичних й абіотичних чинників. Здобувач особисто отримував експериментальні зразки, проводив вивчення їх імунобіологічних властивостей в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*. Автором проведена математико-статистична обробка отриманих результатів, їх аналіз та узагальнення, на основі чого визначено основні теоретичні та практичні положення, надано практичні рекомендації та висновки.

Особистий внесок здобувача у всіх опублікованих зі співавторами працях складає основну частку науково-практичної участі і наводиться за текстом



дисертації та автореферату у списку наукових публікацій. 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.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації було оприлюднено на міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні» (м. Дніпро, 12-13 червня 2020 р.); науково-практичній конференції «Мікробіологічні читання пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського» (м. Харків, 12 лютого 2020 р.); 6-й міжнародній конференції «Кластерні та наноструктурні матеріали» (м. Ужгород, 5-6 жовтня 2020 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: досвід та нові напрямки розвитку» (м. Харків, 11-12 квітня, 2019 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» (м. Львів, 24-25 серпня 2018 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика: Актуальні питання взаємодії» (м. Київ, 31 червня-1 вересня 2018 р.); всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (м. Запоріжжя, 11-12 травня 2017 р.); науково-практичної конференції з участю міжнародних спеціалістів «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями» (м. Харків, 15 травня 2015 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених (Суми, 16-18 квітня 2014 р.); науково-практичної конференції «Наукові засади боротьби з інфекційними хворобами в Україні» (м. Київ, 8-9 жовтня 2014 р.); науково-практичної конференції «Фармацевтична мікробіологія і клінічна лабораторна діагностика» (м. Харків, 27-28 листопада 2014 р.); XIII з'їзді товариства мікробіологів України (Ялта, 1-6 жовтня 2013 г.); науково-практичної конференції «Вклад молодих вчених в розвиток медичної науки і практики» (м. Харків, 13 листопада 2007 р.).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 60 наукових праць (5 – одноосібно), у тому числі 1 зарубіжна колективна монографія, 32 статті у наукових фахових виданнях, з них 8 – в іноземних фахових наукових журналах (3 статті у виданнях, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 23 у наукових фахових виданнях України (12 входять до міжнародних наукометричних баз); 1 патент України на винахід; 5 патентів України на корисну модель; 2 методичні рекомендації; 1 інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я; 1 свідоцтво про первинне депонування штаму; 4 галузевих нововведення у сфері охорони здоров'я; 13 тез у збірниках конференцій та форумів.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 407 сторінках друкованого тексту (основний текст на 312 стор.), містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, шість розділів власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, практичні рекомендації та список використаних першоджерел (504 посилань). Дисертаційна робота містить 80 таблиць, 48 рисунків і 3 додатки.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**В огляді літератури** узагальнено дані щодо мікроекологічних аспектів слизових оболонок верхніх дихальних шляхів при хронічних інфекціях стафілококового генезу, поширеності стафілококового бактеріоносійства серед декретованого контингенту, розповсюдженості та ролі лактобацил у підтримці гомеостазу макроорганізму, висвітлені механізми активації тол-подібних рецепторів (TLR) під впливом структурних компонентів пробіотичних мікроорганізмів і результати застосування пробіотиків у лікуванні захворювань верхніх дихальних шляхів у світовій практиці. Представлено огляд сучасних напрямів створення, удосконалення та застосування пробіотичних, пребіотичних і синбіотичних препаратів та надано теоретичне обґрунтування застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль при розробці імунобіологічних препаратів.

**Матеріали та методи досліджень.** У роботі наведено дані бактеріологічного обстеження 288 пацієнтів, що знаходились на амбулаторному лікуванні у відділенні отоларингології Комунального неприбуткового підприємства Харківської міської ради «Харківська міська студентська лікарня» (КНП ХМР ХМСЛ) у 2012-2016 роках, 89 медичних працівників зазначеного закладу (здорові носії *S. aureus*) та 10 практично здорових осіб.

Досліджено 1160 клінічних ізолятів, з них 69 *S. aureus* та 91 *Lactobacillus* spp.: 51 з кішечника бджіл, 33 з ротоглотки людей і 7 штамів (*L. acidophilus*, *L. acidophilus* R0052, *L. plantarum* 38, *L. fermentum* 39, *L. fermentum* 90T-C4, *L. rhamnosus* GG (LGG або ATCC 53103) та *L. rhamnosus* R0011), ізольованих з фармацевтичних пробіотичних препаратів та біологічно активних добавок, які є в аптеках у вільному доступі: LACIDOFIL®-WM (“WORLD MEDICINE LIMITED”, GREAT BRITAIN), Лактобактерин® (Біофарма, ЧАО, г. Київ, Україна), DermaPRO® (Delta Medical Promotions AG, Switzerland), Acidophilus® (Nutricare Internacional, USA). Клінічні ізоляти *S. aureus*, *Lactobacillus* spp., *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Corynebacterium* spp., гриби роду *Candida* було отримано з бактеріологічної лабораторії КНП ХМР ХМСЛ. Еталонні штами *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* 209 P, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 6783, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pyogenes* ATCC 19615, *C. albicans* ATCC 885-653 отримані з Музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН». Дослідження біологічних властивостей мікроорганізмів проводили в умовах атестованої лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН».

Суспензії мікроорганізмів готували відповідно до стандарту оптичної густини 1,0 одиниць за шкалою McFarland за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм) згідно з інструкцією до приладу та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ.

Мікроаерофільні умови культивування створювали у анаеростатах за допомогою газогенеруючих пакетів Generator GENbox microaer (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> та 85 % N<sub>2</sub>), виробництва bioMerieux, Франція.

Ідентифікацію вилучених культур мікроорганізмів здійснювали за біохімічними властивостями у тест-системах API (bioMérieux, Франція). Отримані результати були оброблені за допомогою програмного забезпечення API Lab Plus.

Одночасне визначення гемолізинів та лецитинази проводили за авторською методикою Рижкової Т. А. та ін., 2008.

Кількісне визначення плазмокоагулазної активності проводили з використанням прискореної методики кількісного визначення активності плазмокоагулази за допомогою двократних серійних розведень (Нікітін В. М., 1986).

Визначення адгезивних властивостей мікроорганізмів проводили за методикою Бріліса В. І. та ін., 1986.

Біоплівкоутворення визначали у полістирольних планшетах за методикою L.V. Rodrigues et al., 2010.

Дослідження антагоністичної активності мікроорганізмів проводили методом відстрочених посівів (перпендикулярних штрихів) (Єгоров Н. С., 1965), *Lactobacillus spp.* – в модифікації Єрмоленко Е. І. та ін., 2004.

Визначення чутливості вилучених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів проводили за допомогою диск-дифузійного методу Bauer-Kirby на середовищі Мюллер-Хінтона згідно міжнародних протоколів та нормативних документів МОЗ України. Кількісне визначення чутливості досліджуваних мікроорганізмів до протимікробних препаратів проводили методом послідовних двократних розведень антибіотичних препаратів у рідкому бульйоні (Наказ МОЗ України № 167, 2001; EUCAST, v. 1, 2016).

Ростові властивості вивчали, враховуючи приріст кількості життєздатних мікробних клітин та біомаси за визначений час (Ієрусалимський Н. Д., 1963; Перт С. Дж., 1978, Пирог Т. М., 2002).

Визначення кількості окисненої глюкози проводили за авторською методикою здобувача (Калініченко С. В. та ін., 2012).

Отримання ЛПС та вивчення його складу проводилось за допомогою хромато-масс-спектрометричної системи Agilent і ядерної магнітно-резонансної спектроскопії на базі відділу біохімії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України, який очолює д. біол. н., проф. Варбанець Л. Д., за що автор висловлює щире подяку. Дифтерійний екзотоксин отримано з АТ «Біолік», згідно договору про співпрацю.

Для отримання поверхневих антигенних структур застосовували стандартні високочастотні генератори Г4-141 і Г4-142 зі щільністю потоку потужності в області розташування об'єкту  $0,1 \text{ мВт/см}^2$  при середній інтенсивності генератора 10 мВт та ультразвукові прилади ГЗ-109 (60 кГц) та УЗДН-2Т (44 кГц). Діапазон та тривалість впливу фізичних чинників змінювали згідно з потребами дослідів. Зразки концентрували на експериментальному приладі для випарювання. Всі прилади надані Інститутом радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України згідно договору про співпрацю, як експериментальні.

Як безклітинні супернатанти (БС або метаболіти) використовували безклітинні фільтрати культуральної рідини, які було отримано при культивуванні штамів лактобацил. Для отримання метаболітів готували суспензію добової культури відповідного штаму лактобацил з оптичною густиною 1,0 McF. До 45 мл промислового поживного бульйону з 1 % глюкози додавали 5,0 мл приготованої суспензії. Отриману суміш інкубували при 37 °С впродовж 72 год за аеробних або мікроаерофільних умов, після чого центрифугували при 3000 об/хв впродовж 30 хв три рази, відбирали супернатант та пропускали через стерильні міліпорові фільтри з діаметром пор 0,2 мкм. Отримані метаболіти перевіряли на стерильність, для чого по 1,0 мл отриманих метаболітів засівали в 9,0 мл тіогліколевого середовища та бульйону Сабуро. Інкубували протягом 8 діб, кожену добу візуально оцінювали наявність або відсутність росту у відповідному середовищі. Для руйнування H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> отримані метаболіти витримували добу при денному освітленні, визначали рН та для нейтралізації молочної кислоти, додавали луг до досягнення значення рН 7,2.

Як безклітинні антигенні комплекси (БА або антиадгезини) використовували безклітинні фільтрати мікробних суспензій, які було отримано при застосуванні фізичних чинників.

Визначення білкового азоту (PNU) в метаболітах проводили згідно Державної Фармакопеї України (ДФУ, 2016) методом з попереднім осадженням білкових компонентів трихлороцтовою (ТХО) кислотою.

Кількісну оцінку вмісту білка в досліджуваних препаратах проводили за допомогою спектрофотометрії (спектрофотометр СФ-56 «Ломо-спектр», ДУ «ІМІ НАМН») за методом Lowry O. H. та ін., 1951.

Характеристика біохімічного складу досліджуваних препаратів (вміст тейхоєвих кислот) здійснено на кафедрі біохімії Харківського національного медичного університету за методом Арчібальда А. Р. в модифікації Лівінської О. П. зі співав., 2012. Молекулярно-масовий розподіл пептидних фракцій дифтерійного екзотоксину та метаболітів лактобацил проводили за допомогою гель-фільтраційної хроматографії, згідно з методикою, описаною Гальченко С. Є., 2005.

Вивчення фагоцитарної активності проводили, визначаючи фагоцитарний індекс (ФІ) та показник фагоцитозу (ПФ) за стандартною методикою. Як тест-мікроорганізм використовували референс-штам *S. aureus* 209 P (АТСС 6538-Р). Кисневий метаболізм нейтрофілів визначали за допомогою тесту з нітросинім тетразолієм (Передерий В. Г. и др., 1995).

Визначення лізоциму в біологічних рідинах визначали фотометричним методом за допомогою комерційних наборів ВекторБест, РФ.

Концентрацію sIgA визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу за допомогою комерційних наборів ВекторБест, РФ.

Стан місцевого імунітету слизових оболонок носових порожнин тварин визначали за методом Самуйлова Ю. Ю., 2007. Виділення зі слизових оболонок носових ходів кролів для досліджень отримували так: в кожний носовий хід, поперемінно, спеціальним реплікатором вводили спеціалізовану стрічку та витримували 5 хвилин для просочування слизом, після чого відокремлювали за

допомогою шприца, переносили в стерильну пробірку з 0,5 мл фізіологічного розчину, ретельно перемішуючи.

Вивчення безпечності та алергенності досліджуваних експериментальних зразків БС і БА проводили згідно Стандарт Настанови МОЗУ 42-6:0:2014 «Настанова. Лікарські засоби. Доклінічні дослідження безпеки як підґрунтя клінічних випробувань за участю людини та реєстрації лікарських засобів» за здатністю до підвищення виживання тварин.

Дослідження з використанням лабораторних тварин виконані на базі віварію ДУ «ІМІ НАМН» та віварію ХНМУ. Тварини утримувалися у стандартних умовах віварію. Експерименти на тваринах були проведені у відповідності до положень вітчизняних і міжнародних біоетичних документів: IV «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, ETS 123, 1986), законодавчих документів України з проведення експериментів на тваринах: «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (20.09.2001), методичні рекомендації «Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах (Резніков О. Г. та ін., 2007) та були ухвалені Комітетом з біоетики ДУ «ІМІ НАМН». Усі тварини під час експерименту отримували стандартний раціон віварію та мали відповідні умови утримання.

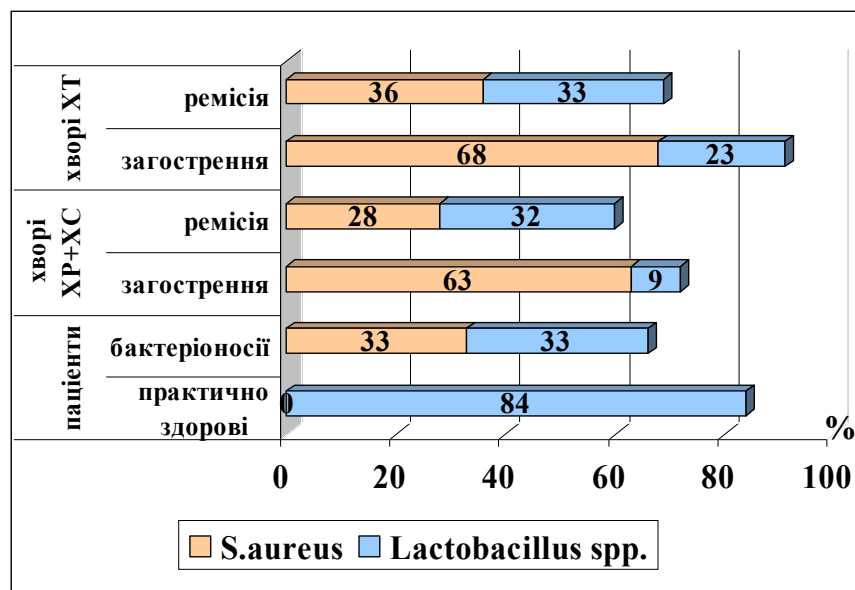
Молекулярно-генетичну ідентифікацію перспективних штамів лактобацил проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції з випадковою ампліфікацією поліморфної ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction, RAPD-PCR). Для постановки ПЛР використовували набір реактивів «Амплиценс PCR» (РФ) та ампліфікатор «Терцик» («ДНК-технологія», РФ).

Всі експерименти проводили три-чотири рази. Кожен зразок тестували в двох-трьох повторях. Отримані дані статистично обробляли за допомогою програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA) або Excel 2003, 2010 (Microsoft, США). Вираховувались середні арифметичні значення для ряду даних (M) та похибки середніх величин (m). Достовірність отриманих даних оцінювали шляхом парного порівняння та визначення довірчого інтервалу на підставі розрахунку коефіцієнта Стюдента (t). Проводили однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та подальше множинне порівняння із застосуванням критерію Стюдента з корекцією Бонферроні, критерію Фішера або непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. Відмінності між отриманими показниками вважали статистично значущими при  $p \leq 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для визначення ролі *S. aureus* у розвитку хронічних запальних захворювань верхніх дихальних шляхів (хронічний тонзиліт (ХТ), хронічний риніт (ХР), хронічний синусит (ХС), носійство *S. aureus*) важливо було проаналізувати мікробіоценози ВДШ пацієнтів на вищезазначені захворювання за концентрацією та видовим складом мікробіоти. Встановлено, що при загостренні ХТ *S. aureus* займав друге місце як етіологічний агент та виділявся у 69,4 % хворих, а *Lactobacillus spp.* виділялись лише у 21,4 % хворих. Зі слизових оболонок носа хворих на ХР і ХС, в стадії

ремісії, найчастіше виділялись *Lactobacillus* spp., непатогенні представники роду *Neisseria*, *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, бактерії роду *Fusobacterium*, тоді як при загостренні процесу найчастіше виділявся *S. aureus* – у 63,9 % хворих, а *Lactobacillus* spp. виділялись лише у 6,4 % хворих. Зі слизових оболонок носа практично здорових осіб найчастіше виділялись коагулазонегативні стафілококи, непатогенні нейсерії, непатогенні коринебактерії, аерококи та лактобацили.

Порівняльний аналіз мікробіоценозів показав низький популяційний рівень бактерій роду *Lactobacillus* при хронічних інфекціях ВДШ. Співвідношення *S. aureus/Lactobacillus* spp. на слизових оболонках було практично на одному рівні при ремісії і бактеріоносійстві, тоді як при загостренні хронічних хвороб спостерігалось зниження популяції лактобацил, в 3,6-4,2 раза ( $p < 0,01$ ) (рис. 1).



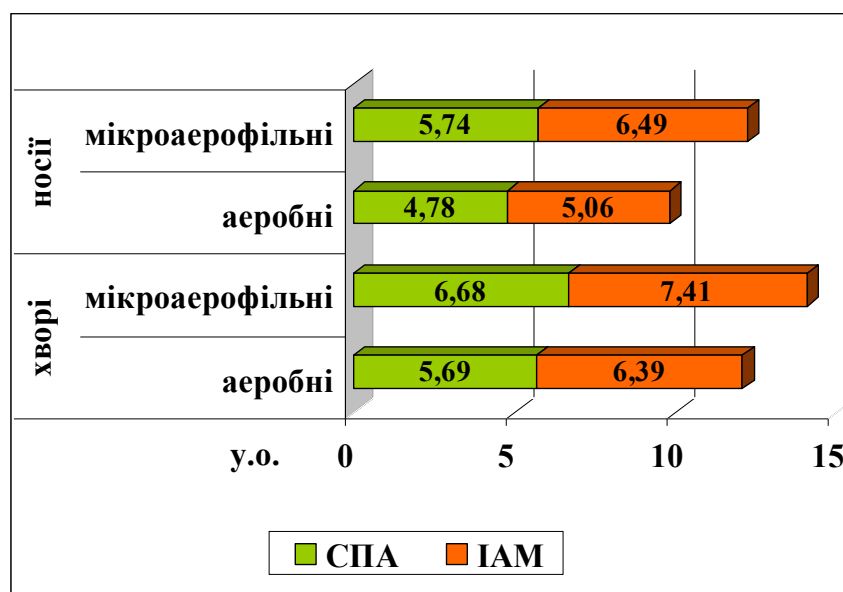
**Рис. 1.** Порівняльний аналіз співвідношення *S. aureus/Lactobacillus* spp. на слизових оболонках ВДШ обстежених

Приведені вище дані дозволяють припустити, що зниження популяції *Lactobacillus* spp. на слизових носоглотки призводить до ослаблення місцевої ланки імунної системи, що обумовлює або розвиток бактеріоносійства, або хронізацію запального процесу з тривалим порушенням гомеостазу макроорганізму. Тривале порушення гомеостазу тканин може призводити до зниження в них концентрацій кисню, що може впливати на біологічні властивості патогена.

Для вивчення складових патогенетичної дії збудника в умовах низьких концентрацій кисню, нами було проведено вивчення та порівняння біологічних властивостей *S. aureus* протягом 10 пасажів за аеробних і мікроаерофільних умов їх культивування.

Дослідження впливу умов зниженого парціального тиску кисню на колонізаційну здатність клінічних ізолятів *S. aureus* показало наявність лінійного прямопропорційного зв'язку середньої сили між кількістю пересівів

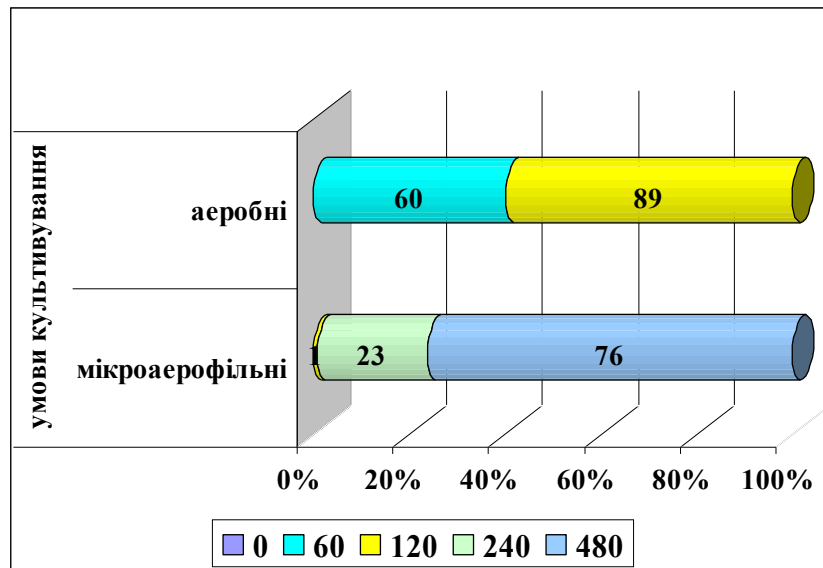
культур за мікроаерофільних умов вирощування та показниками СПА ( $r = 0,76$ ) і слабкої сили між кратністю пасажів та ІАМ ( $r = 0,59$ ). Найвищий індекс адгезивної активності мали штами, ізольовані зі слизових оболонок носа хворих та носіїв, відповідно ( $6,39 \pm 0,36$ ) та ( $5,06 \pm 0,28$ ). Після 8-10 пасажів в умовах мікроаерації цей показник збільшувався, в середньому, в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Таким чином, встановлено, що за умов мікроаерації відбувається стимуляція адгезивних властивостей клінічних ізолятів *S. aureus*, що може сприяти подальшій колонізації цим патогеном слизових оболонок ВДШ (рис. 2).



**Рис. 2.** Адгезивні властивості ізолятів *S. aureus*, виділених від хворих і носіїв, за різних умов газового складу атмосфери культивування

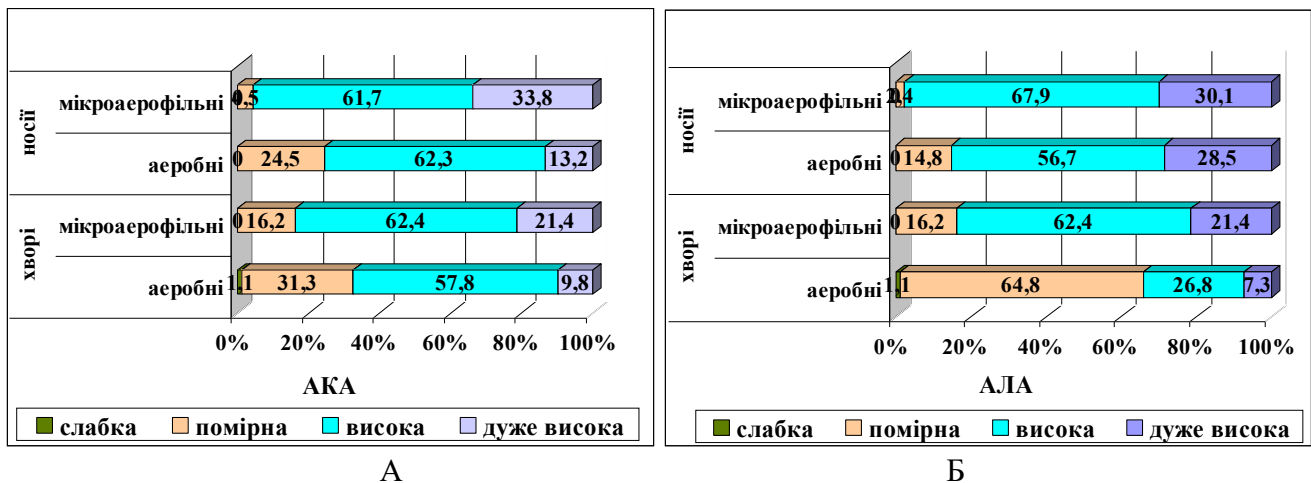
Вивчення факторів патогенності (ФП) клінічних штамів *S. aureus* за аеробних умов культивування встановило, що лецитиназа виявлялась через 24 години у 78,1 % ізолятів від хворих та у 85,2 % ізолятів від носіїв. За умов мікроаерації лецитиназа виявлялась через 24 години у 100 % ізолятів і не змінювалась протягом 10 пасажів.

Кількісне визначення активності екстрацелюлярної плазмокоагулази показало наступні відмінності: за аеробних умов культивування 89,0 % ізолятів *S. aureus* мали плазмокоагулазну активність на рівні – ( $120 \pm 5$ ) ум.од./мл, 11,0 % – на рівні ( $60 \pm 5$ ) ум.од./мл. За мікроаерофільних умов газового складу атмосфери інкубування зміна активності плазмокоагулази відбувалась після п'ятого пасажу – у 32,1 % штамів активність цього ферменту підвищувалась в 2 рази ( $p < 0,05$ ), а у 14,8 % – в 4 рази ( $p < 0,01$ ). Після 10-го пасажу за умов мікроаерації 75,8 % штамів золотистих стафілококів мали активність плазмокоагулази на рівні ( $480 \pm 5$ ) ум.од./мл, 23,1 % – на рівні ( $240 \pm 5$ ) ум.од./мл, 1,1 % – на рівні ( $120 \pm 5$ ) ум.од./мл (рис. 3).



**Рис. 3.** Питома вага ізолятів *S. aureus*, виділених від хворих і носіїв, з різним рівнем активності плазмокоагулази за аеробних та мікроаерофільних умов інкубації

Кореляційний аналіз персистентного потенціалу (антикомплемента й антилізоцимна активності) за різних умов газового складу атмосфери культивування виявив наявність лінійного прямопропорційного зв'язку середньої сили між кількістю пересівів культур за мікроаерофільних умов вирощування та показниками АКА ( $r=0,74$ ) і та АЛА ( $r=0,79$ ), що може вказувати на модифікаційні зміни факторів персистенції (рис 4).

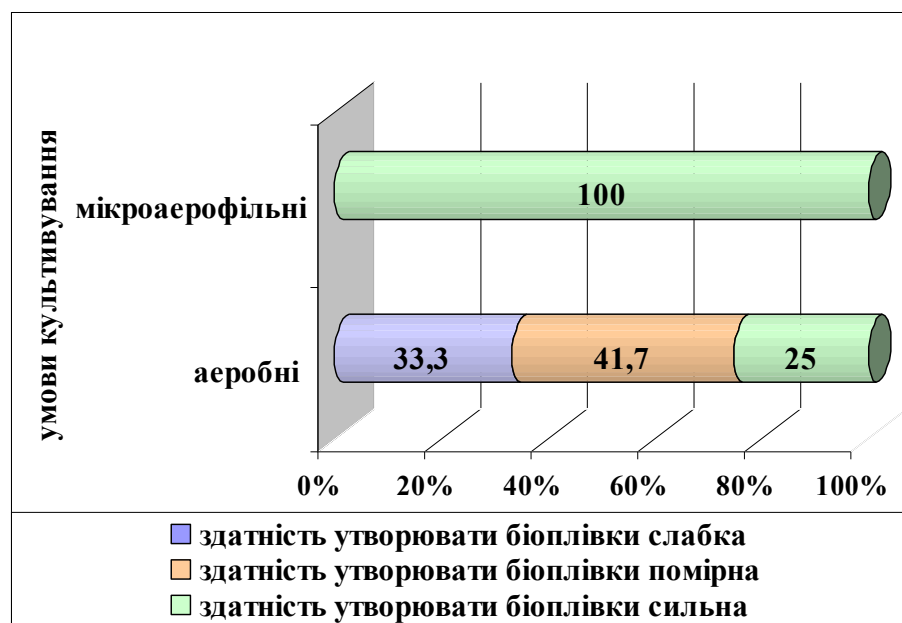


**Рис. 4.** Питома вага ізолятів *S. aureus*, виділених від хворих і носіїв, з різною АКА (А) і АЛА (Б) за аеробних та мікроаерофільних умов культивування

При дослідженні здатності золотистих стафілококів до біоплівкоутворення встановлено, що за аеробних умов культивування 33,3 % клінічних ізолятів проявляли слабку здатність до біоплівкоутворення, 41,7 % – характеризувалися середнім рівнем біоплівкоутворення, а 25,0 % – високим. Причому, тільки 11,8 % і 36,1 % ізолятів зі слизових оболонок носа, відповідно носіїв та хворих,



мали помірну та слабку ступінь утворення біоплівки. За умов мікроаерації, вже після першого пасажу, всі зазначені штами *S. aureus* мали високий рівень біоплівкоутворення (рис. 5).



**Рис. 5.** Питома вага штамів *S. aureus* з різною здатністю утворювати біоплівки за аеробних та мікроаерофільних умов культивування

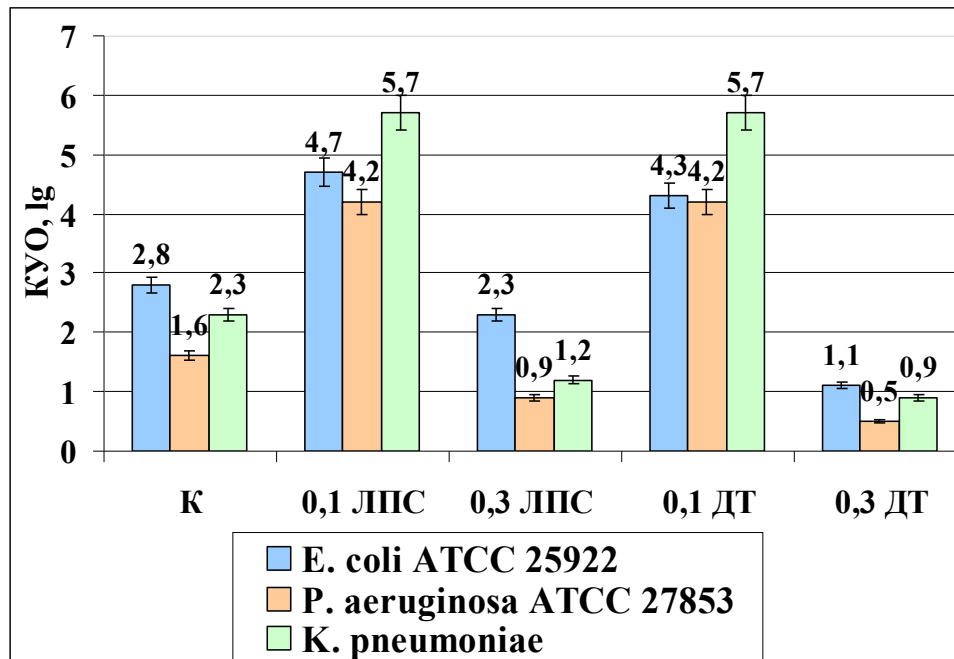
Отримані дані свідчать про те, що в умовах низької концентрації кисню у ізолятів *S. aureus* відбувається стимуляція колонізаційних властивостей, ФП та біоплівкоутворення.

Між представниками мікробних спільнот утворюються неіндиферентні взаємовідносини, однією з форм яких в асоціаціях є мікробний антагонізм за рахунок продукування токсичних для інших видів речовин, в т.ч. бактеріальних токсинів. З метою вивчення антагоністичних факторів, що можуть впливати на міжмікробні взаємовідносини і, таким чином, регулювати популяційний рівень асоціантів, було проведено низку дослідів відносно дії бактеріальних токсинів (екзо та ендо) на біологічні властивості окремих патобіонтів ВДШ. Для цих досліджень було використано натуральний дифтерійний токсин (ДТ) як представник екзотоксинів бактерій та ліпополісахарид (ЛПС) як представник ендотоксинів.

З метою визначення кількості баластних речовин, які можуть викликати непередбачувані реакції, спочатку були проведені хроматографічні дослідження нативного дифтерійного токсину промислового виробництва серій №5 та №001007. ЛПС було отримано водно-фенольним методом із клінічного штаму *E. coli* 126, вилученого від хворого.

Як представники грамнегативних бактерій були взяті референс-штами *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та клінічний ізолят *K. pneumoniae*. Як представники грампозитивних бактерій були взяті референс-штами *S. aureus* ATCC 25923 та *E. faecalis* ATCC 6783.

Встановлено статистично достовірний стимулюючий ефект ростових властивостей у досліджуваних грамнегативних бактерій після додавання бактеріальних токсинів у дозі 0,1 мл на 1,0 мл поживного середовища, а пригнічуючий – у дозі 0,3 мл. (рис.6).

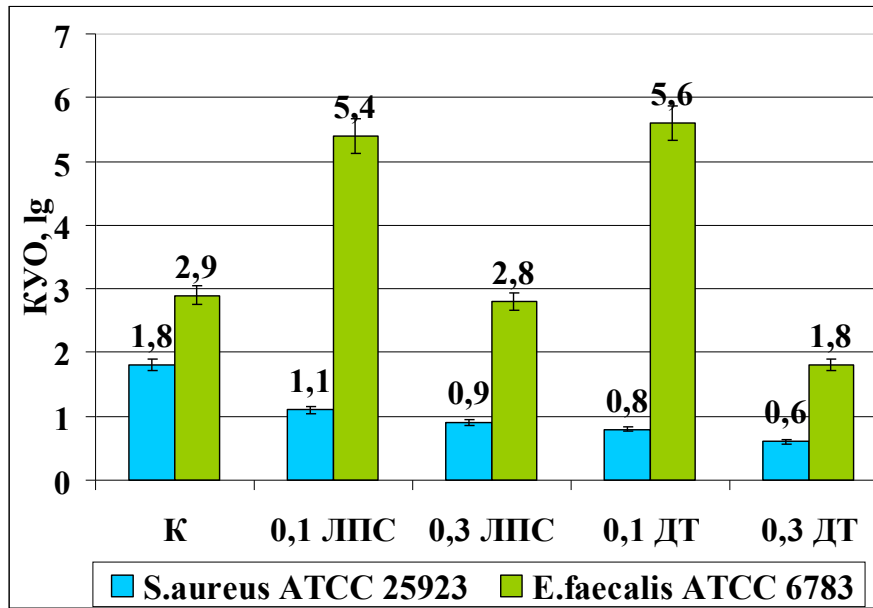


**Рис. 6.** Кінетика росту грамнегативних бактерій

Так, ендотоксин в дозі 0,1 мл на 1,0 мл поживного середовища стимулював через 18 годин накопичення біомаси, порівняно з контролем, *E. coli* ATCC 25922, в 1,67 рази ( $p < 0,01$ ), *P. aeruginosa* ATCC 27853 в 2,62 рази ( $p < 0,01$ ) та *K. pneumoniae* в 2,47 рази ( $p < 0,01$ ). Екзотоксин в дозі 0,1 мг на 1,0 мл поживного середовища через 18 годин також стимулював накопичення біомаси кишкової палички в 1,53 рази ( $p < 0,05$ ), синьогнійної палички в 1,93 ( $p < 0,01$ ) рази, клебсієльозної культури – в 1,69 ( $p < 0,01$ ) рази.

При дослідженні впливу бактеріальних токсинів на грампозитивну мікрофлору встановлено достовірне зниження накопичення біомаси для *S. aureus* ATCC 25923. Так, ДТ в дозі 0,1 мл, в середньому, пригнічував показники кінетики росту зазначеного патобіонта в 22,5 ( $p < 0,001$ ) рази, а в дозі 0,3 мл – в 30 ( $p < 0,001$ ) разів. Тоді, як ліпополісахарид пригнічував показники кінетики росту *S. aureus* ATCC 25923 лише в 1,6 ( $p < 0,05$ ) рази при дозі 0,1 мл і в 2,0 ( $p < 0,01$ ) рази при дозі 0,3 мл.

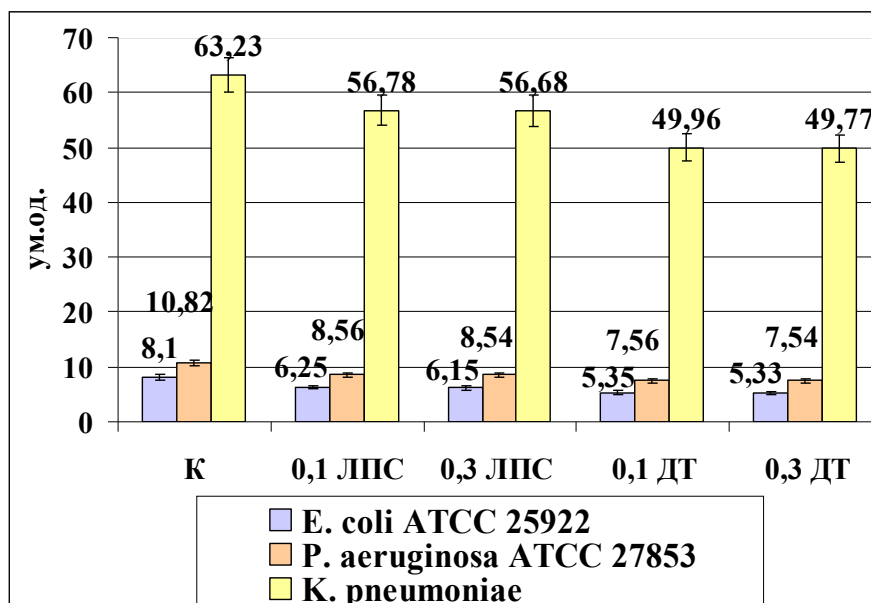
Зовсім інші результати було отримано для еталонного штаму *E. faecalis* ATCC 6783 (рис. 7).



**Рис. 7.** Кінетика росту грампозитивних бактерій

Доза бактеріальних токсинів в 0,1 мл стимулювала накопичення біомаси зазначеного мікроорганізму, в середньому, в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза незалежно від походження токсину. Додавання ДТ в середовище в дозі 0,3 мл знижувало накопичення клітин ентерокока в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза, тоді як додавання ЛПС в дозі 0,3 мл достовірно не впливало на показники кінетики росту *E. faecalis* ATCC 6783 порівняно з контролем.

Оскільки здатність мікроорганізмів до колонізації еукаріотичних клітин обумовлює патогенез багатьох інфекційних захворювань, метою подальших досліджень стало вивчення показників адгезивного процесу, антикомплементарної здатності та антибіотикочутливості у тест-штамів, що підпали під вплив бактеріальних токсинів (рис. 8).



**Рис. 8.** АКА тест-бактерій

Встановлено, що бактеріальні токсини в зазначених вище дозах достовірно не впливали на адгезивні властивості тест-бактерій, проте знижували в 1,3-1,5 ( $p < 0,05$ ) разів їх антикомплементарну активність.

Наступним етапом роботи стало дослідження можливості застосування лактобацил, вилучених з різних екологічних ніш, для нормалізації біоценозів ВДШ. Для цього були взяті штами, ізольовані з пробіотичних препаратів, носоглотки людей та кишечника бджіл.

Всі взяті в досліді пробіотичні культури відповідали основним вимогам єдиної системи оцінки пробіотиків та пробіотичних засобів (WHO Expert Committee on biological standardization. Geneva, 2004), а саме: були каталазонегативні, не продукували лецитиназу, не мали гемолізинів, продукували лізоцим, мали стійкість або помірну чутливість до представників основних груп антибіотиків. Тоді як серед ізолятів, вилучених від людей і бджіл, більша частина штамів не відповідала основним вимогам хоча б за однією ознакою (стійкість до антибіотиків).

Враховуючи вищезазначене, для подальших досліджень було відібрано 36 ізолятів (17 від людей, 12 від бджіл та 7 з пробіотиків). Результати ідентифікації лактобацил при використанні API 50 CHL показали, що більшість клінічних досліджених штамів відносились до *Lactobacillus plantarum* з ІД (індекс дисоціації) (99,8 - 99,9) % подібності до видів наявних у базі даних та з Т (ступінь подібності тест-штаму до типового штаму виду) – (0,26 – 1).

Позитивний вплив пробіотичних бактерій на організм людини обумовлений високими антагоністичними властивостями у біоценозі завдяки продукції антимікробних сполук. Тому була проведена оцінка антагоністичних властивостей штамів лактобацил. Встановлено, що за аеробних умов культивування як штамів-антагоністів, так і тест-культур, ізоляти *Lactobacillus* spp. пригнічували розмноження ізолятів *S. aureus* в 66,6 %, *K. pneumoniae* в 42,8 %, *P. aeruginosa* в 23,6 %, *E. faecalis* в 18,9 % випадків. Частота виявлення вказаної активності залежала від походження штамів-антагоністів. Так, штами, ізольовані від людей та бджіл, проявляли конкурентні властивості в 85,7 % випадків, а пробіотичні штами, крім *L. rhamnosus* GG, практично не впливали на ріст тест-культур.

При культивуванні за мікроаерофільних умов як штамів-антагоністів, так і тест-культур, *Lactobacillus* spp. пригнічували розмноження ізолятів *S. aureus* в 88,3 %, *K. pneumoniae* в 3,2 %, *P. aeruginosa* в 22,8 %, *E. faecalis* в 43,6 % випадків. Тобто, в атмосфері зниженого парціального тиску кисню та підвищеного вмісту вуглекислого газу штами лактобацил продукували більш активні речовини проти кокової мікрофлори (*S. aureus* і *E. faecalis*).

З метою вивчення можливості застосування лактобацил для боротьби з мікроорганізмами, які викликають патологічні стани верхніх дихальних шляхів, була вивчена антагоністична активність відібраних ізолятів щодо таких патобіонтів ВДШ, як *C. diphtheriae* та *S. aureus*, що можуть спричиняти бактеріоносійство. Конкурентні властивості вивчали методом відстроченого антагонізму з визначенням зон затримки росту (табл. 1).

Антагоністична активність лактобацил стосовно золотистих стафілококів за аеробних умов культивування

Штами лактобактерій	Питома вага тест-культур <i>S. aureus</i> із різною чутливістю до антагоністів (n = 24), %			Середні показники зон затримки росту тест-культур, мм (M ± m)
	нечутливі	чутливі	високо-чутливі	
<i>L. acidophilus</i> П	83,3	16,7	0	3,7 ± 0,8
<i>L. plantarum</i> П	79,2	20,8	0	3,9 ± 1,1
<i>L. rhamnosus</i> GG П	0	87,5	12,5	9,9 ± 2,7
<i>L. casei</i> Л	0	70,8	29,2	8,1 ± 2,9
<i>L. rhamnosus</i> Л	75	25	0	3,9 ± 1,3
<i>L. plantarum</i> Л	50	50	0	4,8 ± 1,4
<i>L. acidophilus</i> Б	66,7	33,3	0	3,2 ± 0,9
<i>L. plantarum</i> Б	8,3	79,2	12,5	7,8 ± 4,3
<i>L. fermentum</i> Б	70,8	29,2	0	3,8 ± 1,7

За аеробних умов культивування як штамів-антагоністів, так і тест-культур, 66,7 % всіх досліджених лактобацил володіли здатністю пригнічувати розмноження ізолятів *C. diphtheriae*, але мали недостатню здатність щодо пригнічення росту клінічних ізолятів *S. aureus*.

За аеробних умов культивування, більша кількість ізолятів *S. aureus* мала зони затримки росту на рівні 5-10 мм. Найбільшими антагоністами були наступні штами: *L. rhamnosus* GG П – ізольований з пробіотичного (П) засобу, *L. casei* Л – ізольований від людини (Л) і *L. plantarum* Б – ізольований з кишечника бджіл (Б).

За мікроаерофільних умов культивування питома вага чутливих штамів *S. aureus* до дії продукуємих лактобацилами речовин суттєво збільшувалась.

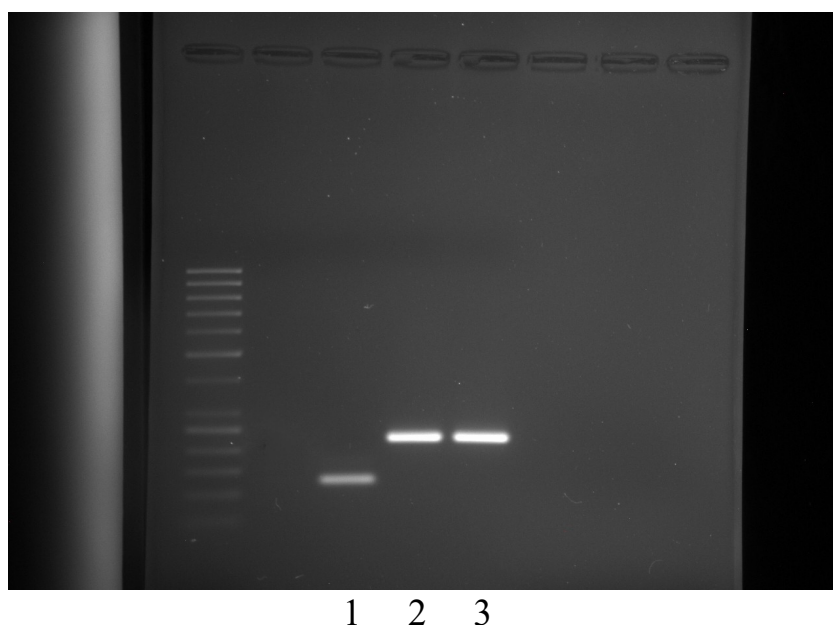
Дослідження антагоністичних властивостей тест-штамів *Lactobacillus* spp. показало, що за мікроаерофільних умов культивування найбільш сильним антагоністом стосовно ізолятів *C. diphtheriae* та *S. aureus* виявився штам *L. plantarum* Б, вилучений з кишечника бджіл. Саме його і було відібрано як штам-кандидат у пробіотики.

Також досить високі антагоністичні властивості проти патобіонтів ВДШ мали ще два штами: *L. rhamnosus* GG П (пробіотичні) та *L. casei* Л (від людей). Зазначені штами були відібрані як потенційні штами-кандидати (табл. 2).

Антагоністична активність представників *Lactobacillus* spp. стосовно клінічних ізолятів *S. aureus* за мікроаерофільних умов культивування

Штами лактобактерій	Питома вага ізолятів <i>S. aureus</i> із різною чутливістю до антагоністів (n = 24), %			Середні показники зон затримки росту тест-культур, мм (M ± m)
	нечутливі	чутливі	високо-чутливі	
<i>L. acidophilus</i> П	41,7	58,3	0	3,9 ± 1,8
<i>L. plantarum</i> П	37,5	62,5	0	4,3 ± 1,9
<i>L. rhamnosus</i> GG П	0	8,3	91,7	11,1 ± 2,9
<i>L. casei</i> Л	0	33,3	66,7	9,6 ± 3,7
<i>L. rhamnosus</i> Л	29,2	66,7	4,1	8,3 ± 3,7
<i>L. plantarum</i> Л	33,3	66,7	0	6,8 ± 2,9
<i>L. acidophilus</i> Б	33,3	66,7	0	7,1 ± 3,3
<i>L. plantarum</i> Б	0	58,3	41,7	12,3 ± 2,9
<i>L. fermentum</i> Б	68,3	31,7	0	3,6 ± 1,7

Нами було проведено видову та внутрішньовидову молекулярно-генетичну ідентифікацію відібраних ізолятів *Lactobacillus* spp. з використанням RAPD-ПЛР. За її результатами всі досліджені ізоляти були віднесені до бактерій роду *Lactobacillus* (рис. 9).



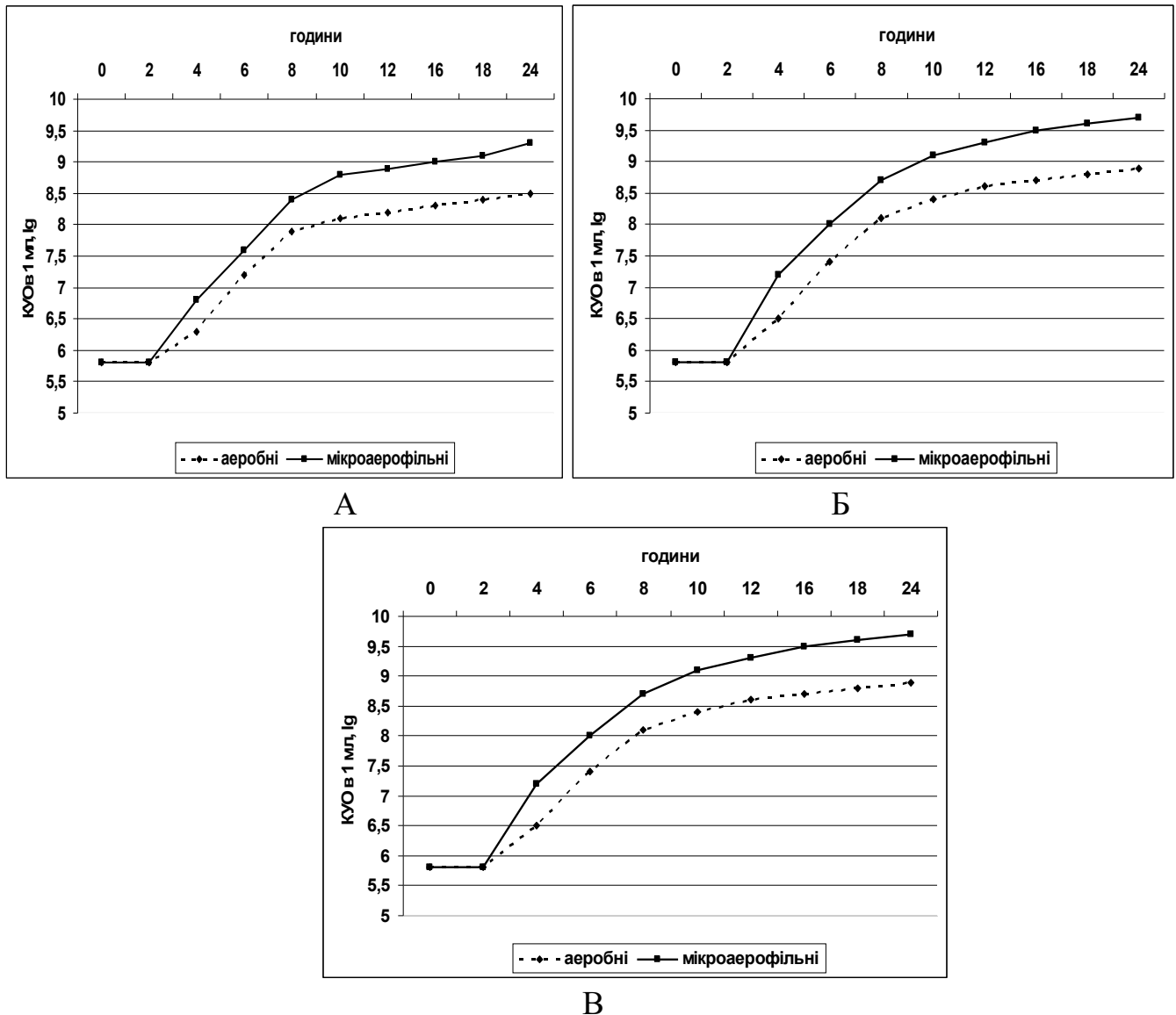
**Рис. 9.** Електрофореграма продуктів ПЛР-ампліфікації фрагментів ДНК лактобацил, отриманих із використанням видоспецифічних праймерів: М – маркер молекулярної маси ДНК GeneRule Mix, 1 – *L. rhamnosus* CCM1825T; 2 – *L. plantarum* CCM4542T; 3 – штам *L. plantarum* Б

Внутрішньовидову ідентифікацію проводили з використанням видоспецифічних праймерів plant R та plant F. Амплікони розміром 300 п. н. було візуалізовано у 34 штамів, що підтверджувало їх належність до виду *L. plantarum*, у т.ч. і для штаму, вилученого з кишечника бджіл. Таким чином, згідно молекулярно-генетичної ідентифікації оригінальний штам віднесено до *Lactobacillus plantarum*.

Для подальшого вивчення можливості застосування штамів лактобацил як потенційних пробіотичних штамів-кандидатів було розроблено метод визначення катаболічної активності мікроорганізмів та вивчено найбільш важливі біологічні (катаболічні, ростові, адгезивні, антагоністичні) властивості лактобацил за аеробних і мікроаерофільних умов культивування.

У процесі досліджень встановлено, що за мікроаерофільних умов підвищувалась кількість спожитої лактобацилами глюкози, в середньому, в 1,3 ( $p < 0,05$ ) рази порівняно з аеробними умовами.

Зміни показників ростових процесів всіх досліджених штамів мали спільні тенденції (рис. 10).

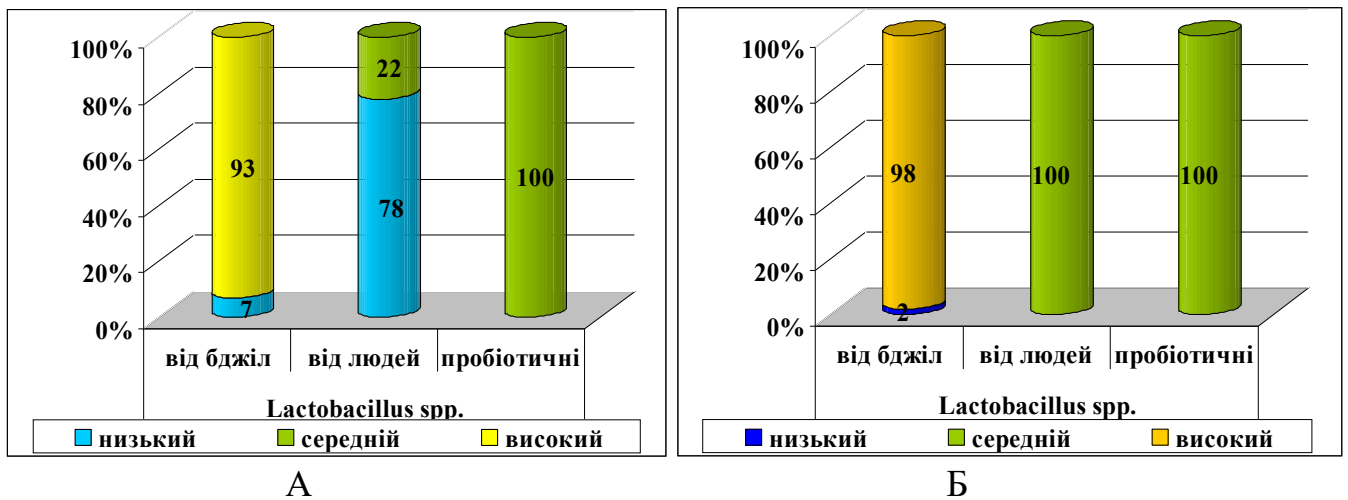


**Рис. 10.** Графіки росту штамів лактобацил за аеробних та мікроаерофільних умов культивування (А – *L. rhamnosus* GG II; Б – *L. casei* Л; В – *L. plantarum* Б).

Динаміка зростання всіх досліджених лактобацил за умов мікроаерації була вищою у порівнянні з аеробними умовами культивування. Найбільші відмінності в показниках, за аеробних та мікроаерофільних умов газового складу атмосфери інкубації, були відзначені для штамів *L. rhamnosus* GG П, *L. casei* Л та *L. plantarum* Б.

Одержані дані дозволяють зробити висновок, що різний газовий склад атмосфери культивування впливає на динаміку росту *Lactobacillus* spp., може бути використано в промисловості для стимуляції накопичення біомаси промислових штамів.

Наступним етапом стало вивчення адгезивних властивостей *Lactobacillus* spp. за різних умов газового складу атмосфери інкубації. Встановлено, що за умов мікроаерації, кількість штамів з середньою та високою адгезивною активністю зростала (рис. 11).

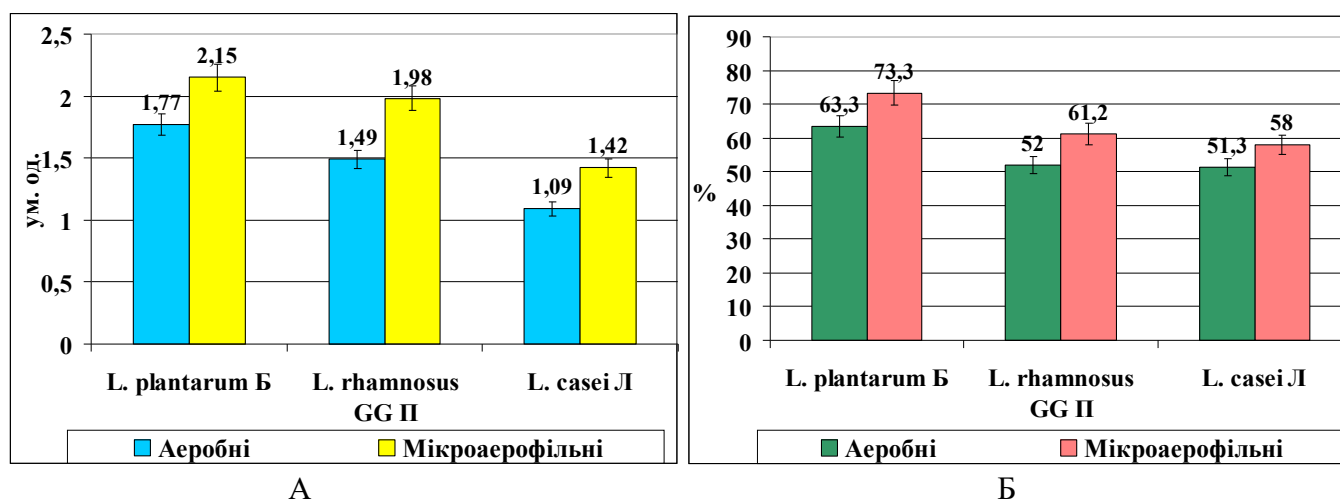


**Рис. 11.** Питома вага лактобацил з різним адгезивним потенціалом за аеробних (А) і мікроаерофільних (Б) умов культивування

Вивчення адгезивної активності обраних штамів-кандидатів трьох штамів лактобацил показало, що ізоляти *L. plantarum* Б і *L. rhamnosus* GG П, незалежно від умов культивування, володіли середніми адгезивними властивостями, тоді як штам *L. casei* Л – низькими.

Показники адгезивної активності всіх *Lactobacillus* spp. за мікроаерофільних умов культивування підвищувались: середній показник адгезії (СПА), в середньому, в 1,2-1,3 ( $p < 0,05$ ) раза, коефіцієнт адгезії (КА) середньому, в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза (рис. 12).

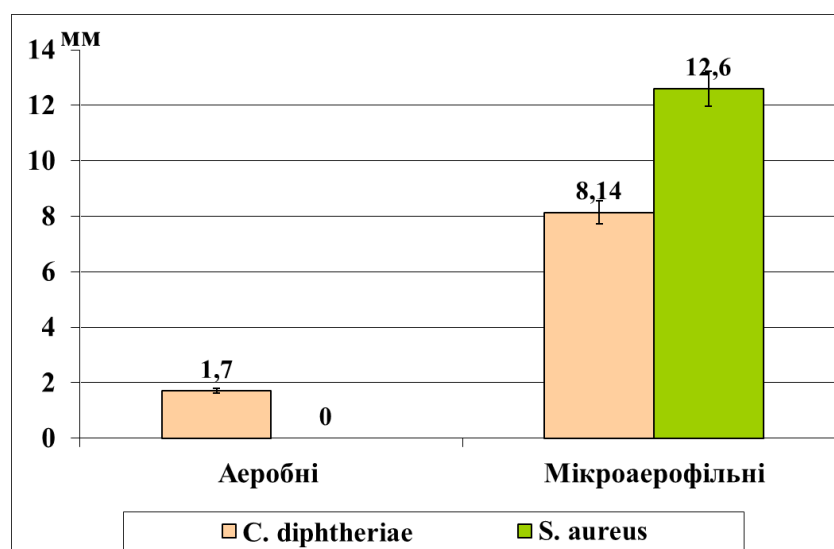




**Рис. 12.** Зміна показників адгезії (А – СПА; Б – КА) за різних умов культивування

Позитивний вплив пробіотичних бактерій на організм людини обумовлений не тільки їх високою здатністю до цитоадгезії та колонізації, а й високими антагоністичними властивостями у біоценозі завдяки продукції антимікробних сполук. У попередніх дослідках було встановлено, що конкурентні властивості *L. rhamnosus* GG II і *L. casei* Л виявилися достовірно нижчими, в 10,8-16,5 ( $p < 0,001$ ) раза, за відповідні показники штаму *L. plantarum* Б, вилученого з кишечника бджіл.

Тому наступною ланкою досліджень було вивчення впливу умов мікроаерації на антагоністичні властивості штаму *L. plantarum* Б щодо таких патогенів, як *C. diphtheriae* та *S. aureus*, що досить часто колонізують слизові оболонки верхніх дихальних шляхів, при цьому інфекційний процес проявляється переважно у вигляді бактеріоносійства (рис. 13).



**Рис. 13.** Антагоністичні властивості *L. plantarum* Б за аеробних та мікроаерофільних умов культивування відносно патобіонтів, що спричиняють бактеріоносійство

З'ясовано, що за мікроаерофільних умов культивування відбувалось достовірне підвищення антагоністичної активності *L. plantarum* Б порівняно з аеробними умовами культивування.

Отримані результати дозволили обґрунтувати доцільність використання штаму *L. plantarum* Б як пробіотичного та депонувати його в Українську колекцію мікроорганізмів як пробіотичний штам-кандидат.

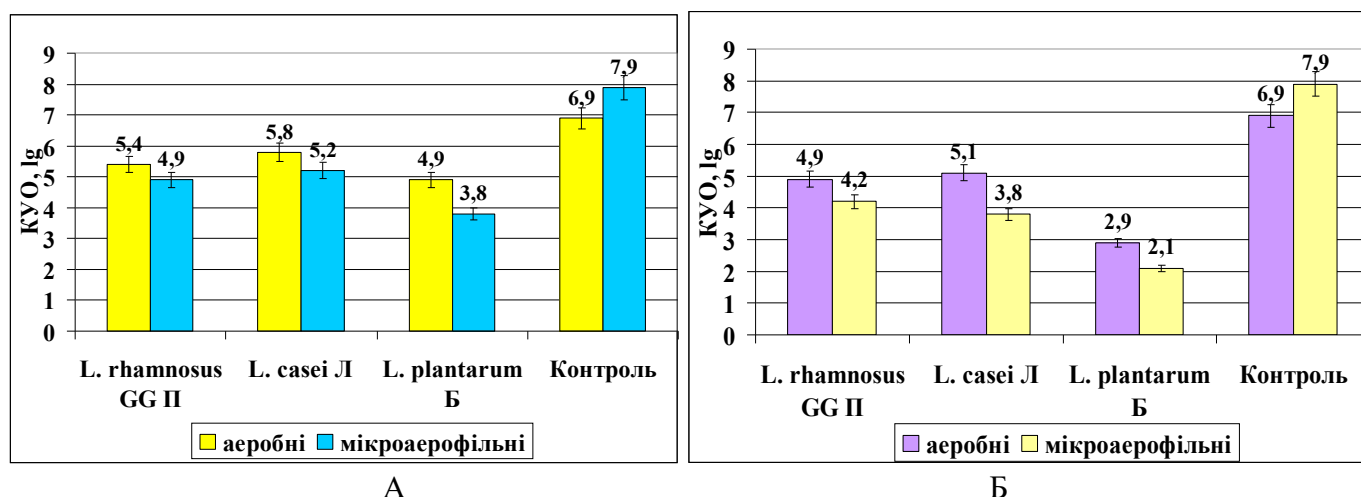
Незважаючи на те, що найкращі показники в скринінгових тестах проявляв штам *L. plantarum* Б, у подальших експериментах були використані метаболіти трьох попередньо відібраних штамів лактобацил (*L. rhamnosus* GG П, *L. casei* Л та *L. plantarum* Б), які було отримано за аеробних і мікроаерофільних умов культивування і досліджено їх вплив на ростові властивості та фактори патогенності (лецитиназна і плазмокоагулазна активності, здатність до біоплівкоутворення) *S. aureus*.

Для стандартизації дослідів в отриманих метаболітах лактобацил визначали вміст білкового азоту (PNU), який в імунобіологічних препаратах такого типу повинен бути на рівні від 0,01 до 0,4 мг/мл. За отриманими результатами, метаболіти концентрували або розводили до вмісту PNU 0,1 та 0,3 мг/мл. Ці дози були обрані тому, що при дослідженні їх сенсibiliзуючих властивостей на лабораторних тваринах (кролі вагою 1,5-2,0 кг) доза 0,1 мг/мл викликала сумнівну місцеву алергічну реакцію (гіперемія шкіри), а доза 0,3 мг/мл викликала слабопозитивну реакцію (поява пухирця з гіперемією шкіри навколо нього). Застосування доз метаболітів лактобацил з більшим вмістом білкового азоту призводило до утворення некрозу в місці введення, що є неприпустимо.

Встановлено, що метаболіти *Lactobacillus* spp., отримані за умов зниженого парціального тиску кисню, мали достовірно більшу інгібуючу здатність, в 1,2-3,9 рази ( $p < 0,05$ ) щодо ростових властивостей тест-культур *S. aureus*. Так, метаболіти *L. rhamnosus* GG П в дозі 0,1 мг/мл достовірно пригнічували ріст стафілококів і за аеробних, і за мікроаерофільних умов культивування *S. aureus* відповідно, в середньому, в 1,2 ( $p < 0,05$ ) та 1,4 ( $p < 0,05$ ) рази, а в дозі 0,3 мг/мл – відповідно в 1,4 ( $p < 0,05$ ) і 1,8 ( $p < 0,05$ ) рази.

Метаболіти *L. casei* Л в дозі 0,1 мг/мл пригнічували розвиток стафілококів і за аеробних, і за мікроаерофільних умов культивування, відповідно в 1,2 ( $p < 0,05$ ) та 1,5 ( $p < 0,05$ ) рази, а в дозі 0,3 мг/мл – в 1,3 ( $p < 0,05$ ) та 1,6 ( $p < 0,05$ ) рази.

Метаболіти *L. plantarum* Б за аеробних і мікроаерофільних умов культивування в дозі 0,1 мг/мл пригнічували ріст *S. aureus* відповідно в 1,4 ( $p < 0,05$ ) та 2,0 ( $p < 0,01$ ) рази, а при збільшенні дози до 0,3 мг/мл пригнічували ріст стафілококів, відповідно, в 2,3 ( $p < 0,01$ ) та 3,7 ( $p < 0,01$ ) рази (рис. 14).



**Рис. 14.** Вплив різних доз метаболітів лактобацил ( А – 0,1 мг/мл; Б – 0,3 мг/мл) на ростові властивості *S. aureus*

При додаванні метаболітів *Lactobacillus* spp. до поживного середовища при вивченні їхнього впливу на лецитиназну активність *S. aureus* встановлено, що при дозі 0,1 мг/мл від 8,1 % до 48,6 % тест-штамів *S. aureus* втрачали лецитиназну активність через 3-5 пасажів на ньому, тоді як при дозі 0,3 мг/мл від 22,9 % до 81,2 % тест-штамів *S. aureus* втрачали лецитиназну активність вже після першого пасажу.

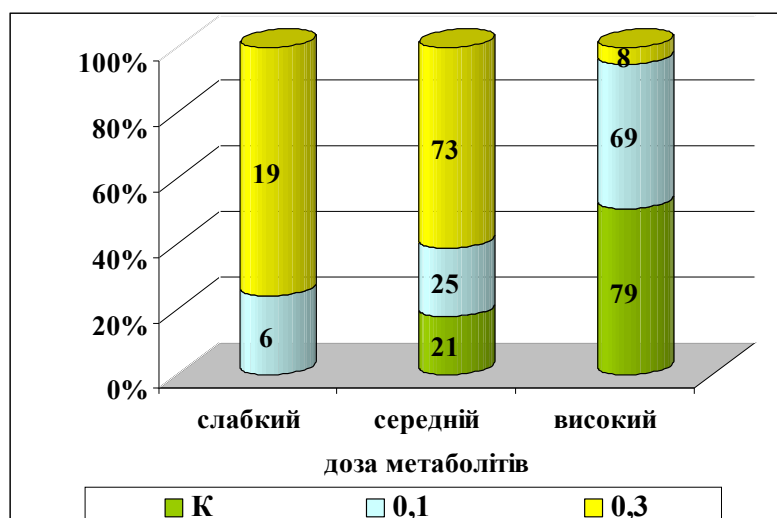
Аналогічні результати були отримані і при вивченні плазмокоагулазної активності золотистих стафілококів. П'ятикратне культивування на середовищах, що містили метаболіти, пригнічувало активність плазмокоагулази до  $(15 \pm 5)$  ум.од/мл у 84,8-97,6 % клінічних ізолятів *S. aureus*. Десятикратне – призвело до припинення росту на щільних середовищах усіх взятих у досліді штамів *S. aureus*.

Дослідження впливу метаболітів *Lactobacillus* spp. на біоплівкоутворення тест-культур *S. aureus* показало прямо пропорційну залежність здатності *S. aureus* до утворення біоплівок від концентрації метаболітів у середовищі.

Доза метаболітів *Lactobacillus* spp. 0,1 мг/мл призводила до зниження штамів з високим ступенем активності, в середньому, в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ), а доза 0,3 мг/мл – у 19,4 раза ( $p < 0,01$ ).

Порівняння між властивостями метаболітів, отриманих від різних штамів *Lactobacillus* spp., щодо їх здатності до пригнічення росту, продукування ферментів патогенності та біоплівкоутворення у *S. aureus* дозволило встановити, що штам, ізольований з кишечника бджіл (*L. plantarum* Б), продукував метаболіти з більш високими показниками інактивації вищезазначених властивостей *S. aureus* та практично не інгібував клінічні ізоляти *Lactobacillus* spp. людини (як представники нормофлори). Згідно рекомендаціям ВООЗ штами, що визначаються з метою подальшого застосування у виробництві, не повинні пригнічувати нормофлору хазяїна. Вивчення впливу метаболітів найактивнішого штаму – *L. plantarum* Б на здатність до біоплівкоутворення клінічних ізолятів *Lactobacillus* spp. ( $n = 7$ ) не показало

достовірної різниці, усі взяті у досліді клінічні ізоляти *Lactobacillus* spp. мали середню ступінь біоплівкоутворення. (рис. 15).



**Рис. 15.** Питома вага ізолятів *S. aureus* з різним ступенем біоплівкоутворення за впливу різних доз метаболітів *Lactobacillus* spp.

Вивчення впливу метаболітів *Lactobacillus* spp. на функціонально-метаболічну активність фагоцитів встановило достовірне стимулювання фагоцитарної активності нейтрофілів, в середньому, в 1,2 рази ( $p < 0,05$ ) та підвищення їх окисного потенціалу в 1,2-2,0 рази ( $p < 0,05$ ). З'ясовано, що реакція фагоцитів не залежала від умов газового складу отримання та дози взятих в експерименті метаболітів.

Ми припустили, що така висока біологічна активність отриманих метаболітів може бути обумовлена сполуками білкового походження (мікробні пептиди). У зв'язку з чим нами було вивчено білковий фракційний склад поживного середовища, на якому отримували метаболіти та метаболітів лактобацил (*L. rhamnosus* GG П, *L. casei* Л і *L. plantarum* Б), отриманих за різних умов газового складу атмосфери їх культивування (аеробні та мікроаерофільні).

При аналізі результатів гель-фільтраційної хроматографії було встановлено наявність великої кількості однозарядних компонентів білкової низькомолекулярної матриці (маса/заряд 300-900), що входили до складу поживного середовища. У всіх досліджених метаболітах лактобацил, окрім низькомолекулярних пептидів, були виявлені пептиди з відносно високою молекулярною вагою (м.в.) – 1195-7670 Да. Оскільки, за даними літератури, молекулярна вага бактеріоцинів лактобацил знаходиться в межах 2-6 кДа, пептиди з м.в.  $\geq 12$  кДа не відбирались.

Експериментально визначено, що за умов атмосфери зниженого парціального тиску кисню у *Lactobacillus* spp. відбувалась стимуляція продукування пептидів з м.в. 2-6 кДа (можливі біоцини) в 1,1-3,1 рази ( $p < 0,05$ ) та знижувалась в 1,3-2,3 рази ( $p < 0,05$ ), питома вага низькомолекулярних білків поживного середовища, що опосередковано вказує на краще засвоєння

поживних речовин з середовища та збільшення антагоністичної активності продуцентів.

Для підтвердження біоцидної дії отриманих фракцій було досліджено методом колодязів їх здатність інгібувати ріст референс-штаму *S. aureus* ATCC 25923. Найбільші зони затримки росту еталонного штаму були при дослідженні фракції А – від 15 до 20 мм. Зони затримки росту *S. aureus* ATCC 25923 у фракції Аа були в межах 10-15 мм, а фракцій В та С – в межах 7-10 мм. Тобто експериментально підтверджено наявність в метаболітах мікробних пептидів з біоцидною дією.

Наступним етапом стало отримання поверхневих антигенів (Ag) *S. aureus*, для чого, попередньо, проводили модуляцію адгезивних властивостей за авторською методикою (Калініченко С. В. та ін., 2007): тест-культуру *S. aureus* ATCC 25923 попередньо опромінювали хвилями міліметрового частотного діапазону 61,0 ГГц протягом восьми годин, а потім обробляли ультразвуком за допомогою приладів ГЗ-109 (60 кГц) та УЗДН-2Т (44 кГц), та вимірювали вміст білка (табл. 3).

Таблиця 3

Концентрація білка (мг/мл) в експериментальних антигенних зразках,  
( $M \pm m$ )

Прилад/час опромінення	Оптична щільність зразка					
	3,0 McFl		5,0 McFl		10,0 McFl	
	К (Ag3К)	Д (Ag3Д)	К (Ag5К)	Д (Ag5Д)	К (Ag10К)	Д (Ag10Д)
УЗДН-2Т/20 хв	0,64 ± 0,2	0,83 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,3 ± 0,3
ГЗ-109/3 год	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	3,3 ± 0,3

Примітки: \* – К неопромінений зразок; Д – опромінений зразок

Встановлено, що попередня обробка суспензії *S. aureus* ATCC 25923 підвищувала вміст білка в зразках в 1,5-1,9 раза ( $p < 0,01$ ).

При вивченні біохімічного складу експериментальних антигенних зразків встановлено, що в зразках, отриманих за допомогою приладу УЗДН переважали наступні амінокислоти: аргінін, лізин, валін та гліцин. Тоді як в зразках, отриманих за допомогою приладу ГЗ-109 переважали аргінін, лізин, валін, аланін та гліцин.

У грампозитивних бактерій до складу клітинних стінок входять тейхоеві кислоти (ТК), які пов'язують із здатністю цих бактерій до адгезії і біоплівкоутворення. На цей час ТК викликають інтерес не тільки як фактори патогенності, але й як агенти, здатні викликати імунну відповідь. Саме тому, наступним етапом стало визначення вмісту ліпотейхоевої і рибіттейхоевої кислот в отриманих нами зразках.

Встановлено, що вміст ліпотейхоевої кислоти перевищував вміст рибіттейхоевої, в середньому, в 16,7 раза ( $p < 0,001$ ) в зразках, отриманих за допомогою приладу УЗДН та в 28,5 раза ( $p < 0,001$ ) в зразках, отриманих за

допомогою приладу ГЗ-109. Оскільки ліпотейхоєва кислота ковалентно пов'язана з вбудованим в клітинну мембрану ліпідом, який діє як регулятор мурамідози та є лігандом для TLR2, що активує систему вродженого імунітету, отримані дані опосередковано свідчать про те, що в експериментальних зразках містяться нативні бактеріальні антигени, спроможні викликати імунну відповідь (табл. 4).

Таблиця 4

Вміст тейхоєвих кислот в експериментальних антигенних зразках, мкг/мл

Тейхоєва кислота	Супернатанти, отримані за допомогою приладу УЗДН			Супернатанти, отримані за допомогою приладу ГЗ-109		
	(Ag3Д)	(Ag5Д)	(Ag10Д)	(Ag3Д)	(Ag5Д)	(Ag10Д)
Ліпотейхоєва	312,68	496,56	594,16	534,18	692,36	788,22
Рибіттейхоєва	22,96	26,98	32,62	18,92	24,56	26,74

Наступною ланкою стало вивчення *in vitro* антиадгезивної властивості експериментальних зразків (табл. 5).

Таблиця 5

Показники адгезивності штаму *S. aureus* ATCC 25923

Зразок	СПА	КА, %	IAM
Контроль	3,94 ± 0,13	82,7 ± 1,02	4,54 ± 0,13
Ag3	3,02 ± 0,12*	68,9 ± 0,98*	3,78 ± 0,14*
Ag5	0,69 ± 0,11**	25,98 ± 1,08**	0,84 ± 0,11**
Ag10	0,93 ± 0,11**	31,82 ± 1,04**	1,21 ± 0,11**

Примітки: \* – достовірно ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем;

\*\* – достовірно ( $p < 0,01$ ) порівняно з контролем

Всі отримані антигенні (Ag) зразки володіли антиадгезивною активністю по відношенню до *S. aureus* ATCC 25923, причому зразок Ag5 (отримано при застосуванні приладу ГЗ-109) проявляв більш виражену антиадгезивну активність. Його і було взято як нативний поверхневий мікробний антиген з антиадгезивною активністю для мукозальної кандидат-вакцини.

Експериментальні зразки (БС, БА) було перевірено на безпечність і алергенність в тестах на лабораторних тваринах. При вивченні безпечності безпородним мишам вводили зразки в об'ємі 0,5 мл перорально за допомогою спеціальної насадки до шприцу. Спостереження за тваринами протягом п'яти діб показало нешкідливість зразків, що досліджувались. Всі тварини були активними, а приріст маси тіла у них наприкінці спостережень, збільшувався, в середньому, на 13 % ( $p \leq 0,05$ ). Дослідження зразків на гостру токсичність проводили на щурах вагою ( $250 \pm 50$ ) г. Зразки вводили з використанням максимальної дози (2000 мг/кг). Результати показали відсутність клінічних симптомів інтоксикації тварин (порушення координації руху, наявність судом, стан волосяного і шкірного покриву, забарвлення слизових оболонок, положення хвоста тощо). Всі тварини протягом терміну спостереження (7 діб)

набирали вагу. Приріст маси тіла у них збільшувався, в середньому, на 10-14 % ( $p \leq 0,05$ ), залежно від способу перевірки та дози зразку. Для вивчення дерматонекротичних властивостей різні концентрації досліджуваних зразків вводили мурчакам внутришньошкірно (гудзик) та щодня, протягом 4 діб, відзначали появу набряку, почервоніння, наявність некрозу або їх відсутність. За отриманими результатами експериментальні зразки не мали дерматонекротичну активність. Дослідження алергенності зразків було проведено у кон'юнктивальному тесті. Швидку реакцію враховували через 15 хв а для визначення гіперчутливості уповільненого типу реакцію враховували через 24 та 48 годин. Отримано негативну реакцію в кон'юнктивальному тесті – у тварин спостерігали відсутність почервоніння слізної протоки, склери та всієї кон'юнктиви. Таким чином, за результатами тестів, встановлено безпечність експериментальних зразків.

Для експериментального визначення можливості застосування представників роду *Lactobacillus* та кандидат-вакцини на основі нативних поверхневих мікробних антигенів для лікування/санації хворих на хронічну ЛОР-патологію стафілококового генезу було розроблено відтворювальні лабораторні моделі хронічного стафілококового тонзиліту та хронічного назального носійства стафілококового генезу у кролів. Як об'єкт були взяті кролі породи «Шиншила» вагою (2,0-2,5) кг. Всі тварини попередньо були обстежені на носійство *S. aureus*. Доза для інфікування та кратність введення підбирались експериментальним шляхом таким чином, щоб забезпечити у кролів нульовий показник летальності та відсутність септичного стану. При моделюванні ХТ такі показники досягнуті при попередній підшкірній однократній сенсibilізації кролів 0,1 мл зависі вбитих нагріванням (1 година при 80 °С) клітин штаму *S. aureus* 209 Р (АТСС 6538-Р) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland та двократним інфікуванням (інтервал 10 діб) 0,1 мл зависі добової культури *S. aureus* 209 Р (АТСС 6538- Р) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland. При моделюванні хронічного назального носійства стафілококового генезу кролів двічі, з інтервалом у 2 доби, підшкірно сенсibilізували 0,1 мл зависі вбитих нагріванням протягом 60 хвилин при 80 °С клітин штаму *S. aureus* 209Р (АТСС 6538-Р) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland. Для індукування катарального риніту проводили попереднє подразнення слизової оболонки порожнини носа 0,1 % розчином декстрану ( $C_6H_{10}O_5$ )  $M_r \sim 70\ 000$  у фізіологічному розчині із розрахунку 30 мкл у кожний носовий хід, з наступним, через добу, інтраназальним інфікуванням кролів стандартизованою (3,0 од. щільності за шкалою McFarland) суспензією живих добових клітин референс-штаму. Інфікування проводили тричі – другий і третій раз, відповідно, через 7 та 14 діб в кількості 0,1 мл дозою 3,0 од. щільності за шкалою McFarland.

При дослідженні можливості застосування представників роду *Lactobacillus* для підвищення резистентності слизових оболонок ротоглотки лабораторних тварин при моделюванні ХТ стафілококового генезу встановлено, що ступінь заселення слизових оболонок зіву інтактних кролів *Lactobacillus* spp. становив  $(5,3 \pm 0,4)$  Іг КУО/г, рівень лізоциму –  $(18,3 \pm 3,8)$  мкг/мл, sIgA –  $(2,41 \pm 0,6)$  мг/мл. Індекс імунної напруги (ІН) слизових оболонок зіву і носа тварин, в

середньому, становив  $(0,41 \pm 0,7)$ . Після моделювання хронічного тонзиліту стафілококового генезу ступінь заселення слизових оболонок тварин *S. aureus* становив, в середньому,  $(5,2 \pm 0,6)$  Іг КУО/г, *Lactobacillus* spp. –  $(2,2 \pm 0,8)$  Іг КУО/г, рівень лізоциму –  $(4,3 \pm 0,2)$  мкг/мл, sIgA –  $(1,23 \pm 0,1)$  мг/мл, а ПН становив  $(0,15 \pm 0,04)$ . Тобто, при моделюванні ХТ відбувається зниження ступеню заселення лактобацилами слизових оболонок тварин, вмісту в них лізоциму і sIgA, що вказує на зниження протиінфекційної резистентності слизових оболонок тварин.

Лабораторним тваринам проводили санацію зіву або 4 % водним розчином еритроміцину ( $n = 6$ ) або суспензією лактобацил з концентрацією  $(9,0 \pm 0,1)$  Іг КУО/мл ( $n = 6$ ), зрошуючи поверхню зіву тричі на день протягом 10 діб. Дослідження ступеню заселення стафілококом слизових оболонок зіву показало, що після санації еритроміцином у 50 % кролів *S. aureus* висівався у кількості  $(1,8 \pm 0,9)$  Іг КУО/г, тоді як у групах тварин, яким було проведено санацію лактобацилами, *S. aureus* не висівався.

У всіх лабораторних тварин спостерігалось підвищення імунологічних показників протиінфекційної резистентності слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, проте у тварин, що отримували лактобацили ступінь заселення лактобацилами слизових оболонок, кількість лізоциму і sIgA були на рівні контрольної групи. Тобто, експериментально показано позитивний вплив лактобацил на протиінфекційну резистентність слизових оболонок верхніх дихальних шляхів.

Можливість застосування представників роду *Lactobacillus* та кандидат-вакцини на основі мікробних поверхневих антигенів для санації/лікування носіїв *S. aureus* було досліджено на лабораторній моделі хронічного риніту стафілококового генезу (табл. 6).

Таблиця 6

Показники протиінфекційної резистентності слизових оболонок носа у кролів до та після моделювання ХР, ( $M \pm m$ )

Групи тварин	Середні показники протиінфекційної резистентності		
	рівень <i>Lactobacillus</i> spp., Іг КУО/г	рівень лізоциму, мкг/мл	рівень sIgA, мг/мл
до моделювання, ( $n = 26$ )	$4,4 \pm 0,8$	$16,9 \pm 3,6$	$2,42 \pm 0,4$
після моделювання, ( $n = 26$ )	$1,3 \pm 0,6^*$	$4,3 \pm 0,6^*$	$1,32 \pm 0,3^{**}$

Примітки: \* –  $p < 0,05$  порівняно з контрольною групою тварин;

\*\* –  $p < 0,01$  порівняно з контрольною групою тварин

У тварин, до і після моделювання ХР, були визначені рівні лізоциму, sIgA і популяційний рівень лактобацил і золотистого стафілококу. Після



моделювання ХР стафілококового генезу у тварин, в середньому, знижувався популяційний рівень *Lactobacillus* spp. в 3,4 раза ( $p < 0,01$ ), рівень лізоциму – в 3,9 раза ( $p < 0,01$ ), рівень sIgA – в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ). Лабораторні тварини, після мікробіологічного підтвердження розвитку ХР стафілококового генезу, були розподілені на наступні групи:

I група (n = 5) кролів, яким протягом 14 діб тричі на добу проводили санацію носа 4 % водним розчином еритроміцину (АБ);

II група (n = 5) кролів, яким протягом 14 діб тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл БА *S. aureus* (Ag5);

III група (n = 5) кролів, яким протягом 14 діб тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл суспензії, що складалась з клітин лактобацил (*Lac*) на ізотонічному розчині (оптична щільність – 3,0 одиниці за шкалою McFarland);

IV група (n = 5) кролів, яким протягом 14 діб тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл композиції, що складалась з клітин лактобацил на ізотонічному розчині (оптична щільність – 3,0 одиниці за шкалою McFarland) і БА *S. aureus*, в співвідношенні 1:1 (5Ag+Lac);

V група (n = 3) кролів – контроль носійства – протягом 14 діб тваринам тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл ізотонічного розчину (К);

VI група – інтактні тварини (I, n = 3). Після чого, через 1, 7, 14 і 30 діб, проводили обстеження тварин з визначенням популяційного рівня *S. aureus* і *Lactobacillus* spp. на слизовій носа, а також показників місцевого імунітету – лізоциму та sIgA (табл. 7).

Таблиця 7

Популяційний рівень *S. aureus* (С) і *Lactobacillus* spp. (Л) на слизовій носу кролів після санації, (M ± m)

Група тварин	Ступінь заселення слизових оболонок носа дослідних тварин (lg КУО/г) через							
	1 добу		7 діб		14 діб		30 діб	
	С	Л	С	Л	С	Л	С	Л
I (АБ)	0,6 ± 0,6**	0,3 ± 0,3	1,8 ± 0,9**	0,6 ± 0,6	2,7 ± 0,9*	0,6 ± 0,6	3,4 ± 1,1*	1,2 ± 0,6
II (Ag)	1,8 ± 0,9**	0,6 ± 0,6	0,9 ± 0,6**	1,8 ± 0,9	0,6 ± 0,6**	2,7 ± 0,6*	0 ± 0**	3,2 ± 0,3*
III (Lac)	0,6 ± 0,6**	1,8 ± 0,3*	0,6 ± 0,6**	2,1 ± 0,3*	0,3 ± 0,3**	3,2 ± 0,3**	0 ± 0**	4,2 ± 0,6**
IV (Ag+Lac)	0,3 ± 0,3**	2,1 ± 0,3*	0,3 ± 0,3**	3,2 ± 0,6*	0 ± 0**	3,6 ± 0,3**	0 ± 0**	4,4 ± 0,6**
V (К)	5,3 ± 0,4	0,3 ± 0,3	5,2 ± 0,4	0,3 ± 0,3	5,3 ± 0,4	0,3 ± 0,3	5,1 ± 0,4	0,6 ± 0,6
VI (I)	0 ± 0	4,2 ± 0,8	0 ± 0	4,4 ± 0,6	0 ± 0	4,4 ± 0,8	0 ± 0	4,4 ± 0,6

Примітки: \* –  $p < 0,05$  порівняно з контрольною групою тварин;

\*\* –  $p < 0,01$  порівняно з контрольною групою тварин

Обробка носових порожнин кролів зразками БА *S. aureus* призводила до поступової ерадикації патогена. Обстеження тварин цієї групи встановило присутність *S. aureus* на слизовій носа в кількості 0,3-1,5 lg КУО/г на 7 добу і в кількості 0,3-0,9 lg КУО/г на 14 добу. На 30 добу *S. aureus* не висівався. В середньому, популяційний рівень *S. aureus* знизився в 3,1 раза ( $p < 0,01$ ), тоді як популяційний рівень *Lactobacillus* spp. достовірно підвищився, в середньому, в 4,5 рази ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з контрольною групою. Рівень лізоциму збільшувався в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), рівень sIgA – в 1,75 раза ( $p < 0,05$ ). Отримані дані свідчать про поступове відновлення протиінфекційної резистентності слизової носа (табл. 8).

Таблиця 8

Рівні лізоциму (Ліз) і секреторного імуноглобуліну А (sIgA) у кролів після санації, (М ± m)

Група тварин	Середні показники лізоциму (мкг/мл) і sIgA (мг/мл) через							
	1 добу		7 діб		14 діб		30 діб	
	Ліз	sIgA	Ліз	sIgA	Ліз	sIgA	Ліз	sIgA
I (АБ)	6,9 ± 1,2*	1,21 ± 0,4	7,7 ± 0,9**	1,91 ± 0,4	9,3 ± 1,1**	2,12 ± 0,6	11,2 ± 0,9**	2,2 ± 0,6*
II (Ag)	6,8 ± 0,9*	1,2 ± 0,3	7,9 ± 0,6**	1,8 ± 0,9	9,6 ± 0,6**	2,1 ± 0,3	12,1 ± 0,9**	2,1 ± 0,3
III (Lac)	6,9 ± 0,6*	1,5 ± 0,3	8,6 ± 0,9**	2,1 ± 0,3	10,3 ± 0,6**	2,2 ± 0,3*	14,3 ± 1,9**	2,3 ± 0,3
IV (Ag+Lac)	7,3 ± 0,6**	1,8 ± 0,3	9,3 ± 0,6**	2,2 ± 0,3	12,4 ± 0,9**	2,4 ± 0,3*	16,7 ± 2,1**	2,6 ± 0,3*
V (К)	4,3 ± 0,4	1,23 ± 0,3	4,2 ± 0,4	1,2 ± 0,3	4,3 ± 0,4	1,3 ± 0,3	4,7 ± 0,6	1,6 ± 0,4
VI (I)	16,9 ± 3,6	2,41 ± 0,6	17,2 ± 3,2	2,42 ± 0,8	17,1 ± 3,4	2,4 ± 0,8	17,3 ± 3,6	2,42 ± 0,8

Примітки: \* –  $p < 0,05$  порівняно з контрольною групою тварин;

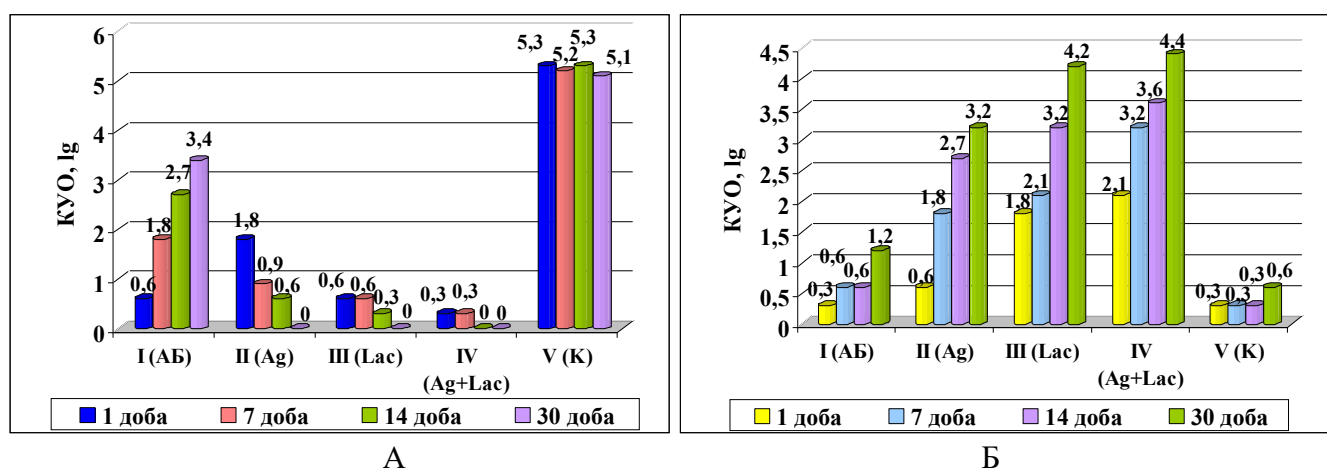
\*\* –  $p < 0,01$  порівняно з контрольною групою тварин

Обробка носових порожнин кролів суспензією лактобацил (Lac) також призводила до поступової ерадикації *S. aureus*. Обстеження слизових оболонок носа тварин цієї групи через 1, 7, 14 і 30 діб після обробки встановило присутність *S. aureus* в кількості (0,3-0,9) lg КУО/г у тварин на 7 добу і в кількості (0-0,3) lg КУО/г на 14 добу. На 30 добу *S. aureus* не висівався. На 30 добу у тварин цієї групи, в середньому, популяційний рівень *Lactobacillus* spp. на слизовій носа збільшувався, в 2,3 раза ( $p < 0,01$ ), рівень лізоциму – в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ), рівень sIgA – в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з першою добою. В середньому, в цій групі тварин, популяційний рівень *S. aureus* знизився в 6,9 раза ( $p < 0,01$ ), тоді як популяційний рівень *Lactobacillus* spp. достовірно підвищився, в середньому, в 7,5 рази ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з контрольною групою. Показники резистентності слизових оболонок були, в середньому, вище

для лізоциму в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ), а для sIgA в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з контрольною групою.

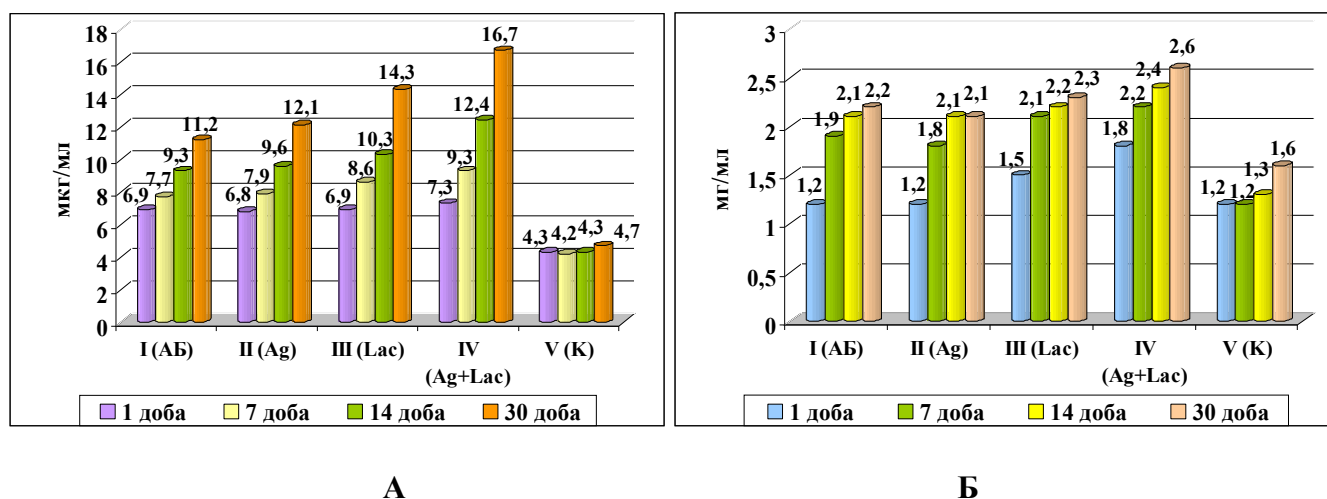
На нашу думку, це може бути пов'язано з активним заселенням лактобацилами даної екологічної ніші і продукцією ними біологічно активних речовин, що інгібують зростання і розвиток стафілококів, а також стимулюють розвиток власної нормофлори, яка, в свою чергу, сприяє відновленню протиінфекційної резистентності слизових оболонок носа.

Обробка носових порожнин кролів композицією, що складалась з БА і суспензії лактобацил (Lac) в співвідношенні 1:1 призводила до повної ерадикації *S. aureus* (рис. 16).



**Рис. 16.** Популяційні рівні *S. aureus* (А) і *Lactobacillus* spp. (Б) у кролів

Обстеження слизової оболонки носа тварин цієї групи вже через 7 дів показало присутність незначної кількості *S. aureus* – (0-0,3) lg КУО/ г. Через 14 і 30 дів після обробки даною композицією *S. aureus* не виділявся. У тварин цієї групи на 30 добу популяційний рівень *Lactobacillus* spp. на слизовій носа збільшувався в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ), рівень лізоциму – в 2,3 раза ( $p < 0,01$ ), рівень sIgA – в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з першою добою(рис. 17).



**Рис. 17.** Рівні лізоциму (А) та sIgA (Б) у кролів

Таким чином, в групі тварин, яким проводили обробку композицією, що складається з БА і суспензії лактобацил, вже на 14 добу після санації відбувалася повна ерадикація *S. aureus* з поступовою нормалізацією протиінфекційної резистентності слизових оболонок носа. Аналіз даних цієї групи показав, що, у порівнянні з групою контролю, популяційний рівень *S. aureus* знижувався, в середньому, в 34,8 раза ( $p < 0,01$ ), тоді як популяційний рівень лактобацил зростає, в середньому, в 8,9 раза ( $p < 0,01$ ). Також, в цій групі, спостерігалось достовірне підвищення рівнів лізоциму, в середньому, в 2,6 раза ( $p < 0,01$ ) і sIgA в 1,7 раза ( $p < 0,01$ ) в порівнянні з групою контролю, що вказує на нормалізацію протиінфекційної резистентності слизових оболонок носа і відновлення її нормофлори

На основі отриманих даних була визначена можливість нормалізації мікробіоценозів носової порожнини за допомогою *Lactobacillus* spp. та поверхневих мікробних антигенів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та експериментальне обґрунтування вирішення актуальної наукової і практичної проблеми – підвищення ефективності профілактики та боротьби з бактеріоносійством *S. aureus* на основі розробки і застосування імунобіологічних препаратів нового покоління із нативними поверхневими мікробними антигенами та пробіотиками, що запобігають персистенції збудника на слизових оболонках ВДШ.

1. Порівняльний аналіз мікробіоценозів як у бактеріоносіїв *S. aureus*, так і у хворих із ЛОР-патологією показав низький популяційний рівень бактерій роду *Lactobacillus* при хронічних інфекціях ВДШ. При хронічних тонзиліті, риніті та синуситі ступінь заселення лактобацилами відповідно становив ( $2,7 \pm 0,4$ ) lg КУО/г та ( $3,7 \pm 0,9$ ) lg КУО/г проти ( $6,64 \pm 0,9$ ) lg КУО/г у практично здорових осіб. У бактеріоносіїв *S. aureus* кількість лактобацил становила ( $2,2 \pm 0,6$ ) lg КУО/г. Визначено, що за умов мікроаерації відбувається зміна активності ферментних систем ізолятів *S. aureus*, яка швидко позначається на проявах вірулентності мікроорганізмів – стимуляції адгезії, ферментів агресії, та біоплівкоутворення. Це може сприяти подальшій колонізації цим патогеном слизових оболонок ВДШ та популяційною зміною мікробіонтів еконіші.

2. З'ясовано, що додавання до поживних середовищ культивування тест-мікроорганізмів екзо- і ендотоксинів в дозі 0,1 мл/мл стимулює ростові й адгезивні властивості грамнегативних тест-культур та підвищує їх здатність до біоплівкоутворення. Збільшення дози бактеріальних токсинів у середовищах культивування до 0,3 мл/мл призводить до пригнічення ростових властивостей у всіх тест-штамів грамнегативних бактерій і у *S. aureus* ATCC 25923 та значимо не впливає на ростові властивості *E. faecalis* ATCC 6783. Бактеріальні токсини, незалежно від дози, знижують в 1,3-1,5 ( $p < 0,05$ ) рази антикомплементарну активність тест-культур, але не впливають на їх колонізаційну здатність. Отримані дані розширюють знання щодо взаємовідносин в складних мікробних спільнотах.

3. Дослідження антагоністичних властивостей представників роду *Lactobacillus* показало їх високий ступінь антагонізму до клінічних ізолятів *S. aureus* і низький до *C. diphtheriae*. Питома вага чутливих штамів становила, відповідно, 66,6 % і 8,2 %. Доведено, що за мікроаерофільних умов культивування найбільш сильним антагоністом стосовно *C. diphtheriae* та *S. aureus* є штам *L. plantarum* Б, до якого питома вага чутливих тест-культур сягала 47,9 % і 88,3 % відповідно. Отримані результати обґрунтовують можливість використання представників роду *Lactobacillus* як платформи розробки нових пробіотичних засобів для регулювання мікробних спільнот ВДШ.

4. Біологічний потенціал представників *Lactobacillus* за різних умов газового складу атмосфери їх інкубації достовірно змінювався. Мікроаерофільні умови сприяли споживанню глюкози дослідженими ізолятами з підвищенням накопичення їх біомаси, в середньому, у 1,8 раза ( $p < 0,05$ ). Крім того, достовірно підвищувались адгезивні властивості: СПА і ІАМ збільшувались, в середньому, в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з аналогічними показниками за аеробних умов культивування. Отримані дані можуть бути використані в промисловості для більш ефективного накопичення біомаси виробничих штамів.

5. Проведено скринінг біологічних властивостей ізолятів лактобацил з подальшою їх молекулярно-генетичною ідентифікацією, що дозволило виявити і депонувати перспективний штам *L. plantarum* ІМВ В-7679 в Українську колекцію мікроорганізмів непатогенних для людини Депозитарію Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Високі антагоністичні властивості та широка доступність штаму *L. plantarum* ІМВ В-7679 дає можливість рекомендувати його як пробіотичний.

6. Встановлено, що метаболіти лактобацил, отримані за умов зниженого парціального тиску кисню, мають достовірно більшу, в 1,2-3,9 раза ( $p < 0,05$ ), інгібуючу здатність щодо ростових властивостей культур *S. aureus*. Отримані зразки безклітинних супернатантів (БС) пригнічують здатність стафілококів до колонізації і біоплівкоутворення, знижують їх фактори патогенності та водночас стимулюють функціонально-метаболічну активність фагоцитів: фагоцитарна активність нейтрофілов в експериментах *in vitro* підвищувалась, в середньому, в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ); окисний потенціал – в 1,2-2,0 раза ( $p < 0,05$ ), здатність утворювати позаклітинні пастки – в 2,3-3,7 раза ( $p < 0,01$ ). При аналізі результатів гель-фільтраційної хроматографії у всіх досліджених зразках БС, були виявлені пептиди з відносно високою молекулярною вагою: 1195-7670 Да, які володіли біоцидною дією.

7. Визначено оптимальні режими отримання безклітинних антигенних комплексів (БА): восьми годинна попередня обробка *S. aureus* АТСС 25923 міліметровими хвилями (61,0 ГГц) з подальшою дезінтеграцією мікробних клітин за допомогою ультразвуку (60 кГц) дозволяє отримати зразки БА, які характеризуються високою антиадгезивною активністю.

8. Всі отримані експериментальні зразки (БС і БА), в тестах на тваринах, перевірено на гостру, загальну токсичність і алергенність та встановлено їх біологічну безпечність. За результатами досліджень складу і антиадгезивних

властивостей експериментальних зразків відібрано найбільш ефективні їх зразки для подальших досліджень *in vivo*.

9. Розроблено адекватні лабораторні моделі хронічного тонзиліту (ХТ) і хронічного риніту (ХР) стафілококового генезу. Доза для інфікування та кратність введення суспензій *S. aureus* АТСС 25923 підбирались емпірично таким чином, щоб забезпечити у кролів нульовий показник летальності та відсутність септичного стану.

10. Показано, що застосування *Lactobacillus* spp. та їх метаболітів для лікування у тварин з лабораторно-модульованими хронічними інфекціями стафілококового генезу підвищує протиінфекційну резистентність їх слизових оболонок за рахунок збільшення популяційного рівня лактобацил та вмісту лізоциму і sIgA в секретах ВДШ. Експериментально обґрунтовано можливість створення мукозальної комбінованої кандидат-вакцини на основі комплексів БА *S. aureus* і пробіотичних штамів *Lactobacillus* spp та/або їх метаболітних сполук.

11. Визначено, що інтраназальне застосування кандидат-вакцини (комплекс, що містить об'ємні частки у співвідношенні 1:1, зразку нативних антигенів *S. aureus* (5Ag) із вмістом білку 1,7 мг/мл і клітини *L. plantarum* ІМВ В-7679 (оптична щільність 3,0 од. за McFarland)) в дозі 0,1 мл тричі на добу впродовж 14 діб відновлює популяційний рівень лактобацил, функціонування місцевої ланки імунної системи та сприяє повній ерадикації *S. aureus* з носової порожнини лабораторних тварин. Доведена імунобіологічна активність кандидат-вакцини шляхом тривалого моніторингу (90 діб) відсутності збудника на слизових оболонках тварин.

### ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

У резидентних бактеріоносіїв *S. aureus* рекомендовано проводити мікробіологічне дослідження якісного і кількісного складу мікробіоти верхніх дихальних шляхів з визначенням популяційних рівней *S. aureus* і *Lactobacillus* spp.

Для профілактики і боротьби зі стафілококовим носійством рекомендовано нові підходи на основі зниження персистенції *S. aureus* на слизових оболонках за рахунок антагоністичних властивостей *Lactobacillus* spp. та блокування адгезивних процесів нативними поверхневими антигенами збудника.

Оптичну щільність суспензій мікроорганізмів доцільно визначати за шкалою McFarland, що надає можливість отримання достовірних і відтворювальних результатів в бактеріологічній практиці, сприяє стандартизації бактеріологічних досліджень та підвищення їх якості.

Для більш успішного і ефективного пошуку нових штамів мікроорганізмів, що доцільно використовувати в промисловості, рекомендовано проводити мікробіологічний скринінг ізолятів згідно розроблених методичних рекомендацій.

Штам *L. plantarum* ІМВ В-7679 рекомендовано в поєднанні з іншими компонентами або як самостійний засіб корекції мікробіоти макроорганізму.

При проведенні досліджень в медичних і фармацевтичних закладах відповідного профілю для вивчення й розробки нових препаратів для профілактики та лікування захворювань стафілококового генезу рекомендовано застосовувати авторські способи, що описують отримання відтворювальних моделей хронічного тонзиліту і риніту стафілококового генезу.

Для впровадження на біотехнологічних підприємствах з випуску імунобіологічних препаратів розроблено схему одержання нативного бактеріального антигенного препарату з біомаси *S. aureus* ATCC 25923 за допомогою фізичних чинників (міліметрових хвиль частотного діапазону 61,0 ГГц з подальшою дезінтеграцією за допомогою ультразвуку з частотою 60 кГц) для подальшого об'єднання з пробіотичними штамами у комбінований протистафілококовий засіб, біологічні властивості якого було апробовано і підтверджено його безпечність та ефективність у доклінічних дослідженнях.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kalinichenko S. V. Modern aspects of development of anti-staphylococcal drugs of a new generation based on *S. aureus* adhesins and probiotic strains of Lactobacilli. *Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine* : collective monograph. Riga : Baltija Publishing, 2020. P 175–192.

2. Study of anti-virus actions of metabolites of Lactobacteria / Svetlana V. Kalinichenko, Kristina V. Melentyeva, Hans Manee, Natalia V. Dubinina, Natalia V. Zvereva, Inna I. Toryanik, Natalia G. Popova, Oleksandr V. Pakhomov. *Wiadomości Lekarskie*. 2020. Vol. LXXIII, № 7. Juli 2020. P. 1484–1488. (Scopus) (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

3. Chronic rhinitis and chronic tonsillitis of staphylococcal genesis in rabbits as laboratory animal model for experimental research / Hans Manee, Olena Korotkykh, Svetlana Kalinichenko, Tatiana Antushev, Natalia Dubinina. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2018. Vol. 31, №. 3, P. 140–143. (Scopus) (Дисертантом проведена розробка дизайну дослідження, аналіз та інтерпретація результатів, написано статтю)

4. Характеристика ЛПС *Escherichia coli* 126 / Л. Д. Варбанец, Э. А. Здоровенко, О. С. Броварская, С. В. Калиниченко. *Микробиология*. 2017. Т. 86, № 1, С. 54–61. (Scopus) (Дисертантом проведено виділення та ідентифікація штаму, вивчення його біологічних властивостей, оформлення паспорту штаму)

5. Імунологічні показники у хворих на хронічний тонзиліт при лікуванні традиційними методами та з застосуванням високоенергетичного лазера / Ханс Мані, Калініченко С. В., Скляр Н. І., Дубініна Н. В. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018. Вип. 1, Т. 1 (142). С. 209–212. (Дисертантом проведена розробка дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

6. The use bacterial lysates in the complex treatment of patients with chronic decompensated tonsillitis / Manee Hans, Sklyar N. I., Kalinichenko S. V., Markovich I. G. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2017. № 4. P. 46–52. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведена розробка дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано текст статті)

7. Коротких О. О., Калініченко С. В., Дубініна Н. В. Характеристика біологічних властивостей лактобацил за аеробних та мікроаерофільних умов атмосфери інкубації. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 3 (2). С. 29–32. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз та інтерпретація результатів, написано статтю)

8. Калініченко С. В., Коротких О. О., Антушева Т. І. Характеристика факторів патогенності штамів *Staphylococcus aureus* за різних умов газового складу атмосфери культивування. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 3, Т. 1 (131). С.173–176. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

9. Коротких О. О., Калініченко С. В. Оцінка цитотоксичної дії екзометаболітів *Lactobacillus plantarum in vitro*. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 1 (2). С. 158–162. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

10. Метод визначення катаболічної активності мікроорганізмів за кількістю окисленої глюкози / Калініченко С. В., Рижкова Т. А., Антушева Т. І., Скляр Н. І., Коротких О. О. *Вісник проблем біології і медицини*. 2012. Вип.4, Т. 2 (97). С. 150–153. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

11. Цитогенетичні ефекти впливу біотичних та абіотичних факторів на дифтерійний токсин / Бабич Є. М., Шкорбатов Ю. Г., Ківва Ф. В., Калініченко С. В., Пасюга В. М., Колпак С. А., Рижкова Т. А., Коваленко О. І., Антушева Т. І. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2009. № 3. С. 58–61. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертант прийняв безпосередню участь у дослідженнях, здійснив аналіз і інтерпретацію результатів, написав статтю)

12. Коротких О. О., Калініченко С. В., Антушева Т. І. Вплив газового складу атмосфери культивування на чутливість *Staphylococcus aureus* до антибіотиків. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2016. № 2 (Т. 20). С. 326–329. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

13. Вплив електромагнітного випромінювання та газового складу атмосфери культивування на здатність стафілококів і коринебактерій до біоплівкоутворення / Попов М. М., Калініченко С. В., Чаусовська Т. А., Бабич Є. М., Коротких О. О., Ківва Ф. В., Коваленко О. І., Балак О. К. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2016. № 26. С. 45–49. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)



14. Вивчення біологічних властивостей пробіотичних штамів *Lactobacillus spp.* при культивуванні їх в аеробних та мікроаерофільних умовах / Бабич Є. М., Калініченко С. В., Коротких О. О., Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Маслій І. Г., Балак А. К., Шкодовська Н. Ю., Багача М. Б. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2014. № 1. С. 33–37. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

15. Калініченко С. В., Коротких О. О., Антушева Т. І. Протиінфекційна резистентність слизових оболонок верхніх дихальних шляхів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 4 (1). С. 269–273. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

16. Біофізична характеристика пливу електромагнітних та ультразвукових хвиль на біооб'єкти / Калініченко С. В., Антушева Т. А., Коротких О. О., Бабич Є. М., Ківва Ф. В., Коваленко О. І., Рижкова Т. А., Балак О. К. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2015. № 3. С. 25–36. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведено аналіз даних наукової літератури, написано статтю)

17. Хроматографічний аналіз екзометаболітів *Lactobacillus plantarum*, отриманих за різних умов газового складу атмосфери культивування та впливу фізичних чинників / Калініченко С. В., Коротких О. О., Бабич Є. М., Ківва Ф. В., Коваленко О. І. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 3, Т. 2 (123). С. 283–289. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

18. Особливості конкурентної активності пробіотичних та вилучених з різних еконіш штамів лактобацил за різних умов газового складу атмосфери культивування / Рижкова Т. А., Калініченко С. В., Бабич Є. М., Скляр Н. І., Хворостяна В. О., Шкодовська Н. Ю., Куцина О. М., Баганча М. Б., Півненко С. Ю. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2014. № 2. С. 64–69. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

19. Лабораторна модель хронічного стафілококового тонзиліту / Скляр Н. І., Калініченко С. В., Рижкова Т. А., Бабич Є. М., Журавльов А. С., Мані Ханс, Ждамарова Л. А., Шкодовская Н. Ю., Балак О. К. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2013. № 1. С. 57–60 URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

20. Прояв антагоністичних властивостей мікроорганізмів при аеробних і мікроаерофільних умовах їх культивування / Рижкова Т. А., Бабич Є. М., Калініченко С. В., Скляр Н. І., Шкодовська Н. Ю., Дубова Л. М., Даниліна С. С., Матюніна Д. М. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2009. № 1. С. 47–52. (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

21. Калініченко С. В. Зміна адгезивної активності мікроорганізмів під впливом дифтерійного екзотоксину. *Вісник проблем біології і медицини* 2008. № 3. С. 82–85.

22. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів / Калініченко С.В., Бабич Є.М., Рижкова Т.А., Маслій І.Г., Коротких О.О., Даніліна С.С., Солянік О.Г., Шикова О.А., Скляр Н.І., Ткач Л.М., Балак А.К., Нємкова С.М., Десятникова О.В. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2013. № 3. С. 5–12. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведено пошук та аналіз вітчизняної та англомовної наукової літератури, написано статтю)

23. Загальна характеристика дифтерійного і правцевого токсинів та їх антигенних дериватів / Калініченко С. В., Бабич Є. М., Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Рябовіл О. В., Плугатор Т. М., Антушева Т. І. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2010. №3. С. 5–8. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертант провів аналіз даних наукової літератури, прийняв безпосередню участь у дослідженнях, написав статтю)

24. Хроматографічні методи: класифікація, принципи та практичне застосування / Рижкова Т. А., Бабич Е. М., Калініченко С. В., Скляр Н. І., Рябовол О. В., Плугатор Т. М., Горбач Т. В., Антушева Т. І., Касьяненко Т. М. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2010. №4. С. 26–34. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведено аналіз даних наукової літератури, редагування статті)

25. General characteristic of the methods for detection of diphtheria toxin / Babych E. M., Ryzhkova T. A., Kalinichenko S. V., Sklyar N. I. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2008. № 4. P. 19–21. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведено пошук та аналіз вітчизняної та англомовної наукової літератури, редагування статті)

26. Калініченко С. В. Вплив дифтерійного токсину на кінетику росту еталонних штамів мікроорганізмів. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна*. Серія медицина. 2008. № 831, Вип. 16. С. 8–12.

27. Бабич Є. М., Калініченко С. В., Рижкова Т. А. Ступінь зміни біологічних властивостей *E.coli*, *K.pneumoniae* та *P.aeruginosa* під впливом екзотоксину *C.diphtheriae*. *Аннали Мечниковського Інституту*. 2007. № 4. С. 24–29. URL : <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm> (Дисертантом проведена розробка концепції і дизайну дослідження, аналіз і інтерпретація результатів, написано статтю)

28. Kalinichenko S. V., Korotkykh O. O., Tishchenko I. Yu. Microecological disorders and their modern correction. *Український біофармацевтичний журнал*. 2016. № 2 (43). С. 6–12. (Дисертантом проведено пошук та аналіз вітчизняної та англомовної наукової літератури, написано статтю, здійснено її переклад англійською мовою)

29. Изучение чувствительности госпитальных штаммов *S. aureus* к действию дезинфектантов / Пономаренко С. В., Антушева Т. И., Калиниченко С. В., Рыжкова Т. А., Ковалева А. А. *Живые и биокосные системы*. 2015. № 13. URL :

<http://www.jbks.ru/archive/issue-13/article-11> (*Дисертантом здійснено виділення та ідентифікація штамів, вивченню їх біологічні властивості*)

30. Біологічні властивості штамів *S. aureus*, вилучених від пацієнтів з хронічною ЛОР-патологією, бактеріоносіїв та об'єктів зовнішнього середовища стаціонарів медичного профілю / Калініченко С. В., Коротких О. О., Антушева Т. І., Антушева Т. О. *ADVANCES OF SCIENCE*. Czech Republic, 2018. Vol. 6. С. 131–136. (*Дисертант провів вивчення біологічних властивостей вилучених від хворих штамів S. aureus, аналіз одержаних результатів, написав статтю*)

31. Kalinichenko S. V. Antiadhesive properties of surface antigen *Staphylococcus aureus*. *Innovative technology in medicine*. Republic of Poland, 2017. Vol. 4. P.163–166.

32. Microbiological aspects of development of anti-staphylococcal drugs based on probiotics strains of lactobacilli / Kalinichenko S. V., Korotkykh O. O., Antusheva T. I., Dubinina N. V. *Innovative technology in medicine*. Republic of Poland, 2017. Vol. 10. P. 180–183. (*Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав статтю*)

33. Пробиотики у лікуванні нозокоміальних захворювань верхніх дихальних шляхів / Калініченко С. В., Коротких О. О., Антушева Т. І., Антушева Т. О. *Science and Society*. Канада, 2018. Vol. 6. С. 583–603. (*Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав статтю*)

34. Спосіб модуляції адгезивних властивостей мікроорганізмів : пат. 79848 Україна. а 2005 07329 / Калініченко С. В., Бабич Є. М., Кучма І. Ю., Волянський Ю. Л., Скляр Н. І., Крестецька С. Л., Драч М. І., Колоколова О. Б., Руденко Л. М., Ківва Ф. В., Коваленко О. І. ; заявл. 22.07.2005 ; опубл. 25.07.2007, Бюл. № 11. (*Дисертант прийняв безпосередню участь у дослідженнях впливу НЗВЧ-опромінення на адгезивні властивості мікроорганізмів, здійснив аналіз і інтерпретація результатів*)

35. Композиція інгредієнтів фітобіотику VITUS-LACT : пат. 135936 Україна. у 2019 1612 / Кривцова М. В., Тимошок Н. О., Співак М. Я., Калініченко С. В. ; заявл. 18.02.2019 ; опубл. 25.07.2019, Бюл. № 14. (*Дисертант прийняв участь у дослідженнях біологічних властивостей штаму L. plantarum ІМВ В-7679*)

36. Спосіб одержання лабораторної моделі хронічного назального носійства стафілококового генезу у кролів : пат. 113116 Україна. у 2016 07616 / Калініченко С. В., Коротких О. О., Бабич Є. М., Антушева Т. І. ; заявл. 11.07.2016 ; опубл. 10.01.2017, Бюл. № 1. (*Дисертант здійснив розробку концепції і дизайну дослідження, прийняв безпосередню участь у дослідженнях, здійснив узагальнення та провів інтерпретацію результатів*)

37. Спосіб одержання моделі хронічного тонзиліту : пат. 70957 Україна. U 2012 00081 / Журавльов А. С., Мані Ханс, Скляр Н. І., Калініченко С. В. ; заявл. 03.01.2012 ; опубл. 25.06.2012, Бюл. № 12. (*Дисертант приймав участь у мікробіологічному обстеженні тварин, здійснив узагальнення та провів інтерпретацію результатів*)

38. Спосіб визначення катаболічної активності мікроорганізмів : пат. 74763 Україна. у 2012 04944 / Калініченко С. В., Бабич Є. М., Антушева Т. І., Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Белозерський В. І., Калініченко О. О. ; заявл. 20.04.2012 ;

опубл. 12.11.2012, Бюл. № 21. *(Дисертант здійснив розробку концепції і дизайну дослідження, прийняв безпосередню участь у дослідженнях, здійснив узагальнення та провів інтерпретацію результатів)*

39. Поживне середовище для одночасного виявлення гемолітичної та лецитиназної активностей мікроорганізмів : пат. 36224 Україна. u 2007 11212 / Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Бабич Є. М., Волянський Ю. Л., Калініченко С. В., Хворостяна В. О., Мізін В. В., Крестецька С. Л. ; заявл. 10.10.2007 ; опубл. 27.10.2008, Бюл. № 20. *(Дисертант прийняв безпосередню участь у дослідженнях, здійснив узагальнення та провів інтерпретацію результатів)*

40. Свідоцтво про первісне депанування штаму мікроорганізму в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України / Свіридов О. В., Скляр Н. І., Калініченко С. В., Попов М. М., Бабич Є. М., Коротких О. О., Тимошок Н. О., Лазаренок Л. М., Бабенко Л. П., Демченко О. А., Бубнов Р. А., Кривцова М. В., Співак М. Я. ; 14.12.2017. *(Дисертант провів ідентифікацію і дослідження біологічних властивостей штаму *L. plantarum* ІМВ В-7679)*

41. Стандартизація приготування мікробних суспензій : [Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006] / Волянський Ю. Л., Мироненко Л. Г., Калініченко С. В., Скляр Н. І., Колоколова О. Б., Ткач Л. В., Перетятко О. Г. К.: Укрмедпатентінформ, 2006. 10 с. *(Дисертант провів експериментальні дослідження, здійснив аналіз результатів, написав текст інформаційного листа)*

42. Спосіб стандартизації приготування мікробних суспензій (МС) [нововведення] / Волянський Ю. Л., Мироненко Л. Г., Калініченко С. В., Скляр Н. І., Колоколова О. Б., Ткач Л. В., Перетятко О. Г. *Інформ. бюлетень АМН України* (додаток до Журналу Академії медичних наук України). 2007. Вип. 22. С. 72–73. *(Дисертант провів експериментальні дослідження, здійснив аналіз результатів, написав та оформив нововведення)*

43. Спосіб модуляції адгезивних властивостей мікроорганізмів [нововведення] / Калініченко С. В., Бабич Є. М., Кучма І. Ю., Волянський Ю. Л., Скляр Н. І., Крестецька С. Л., Драч М. І., Колоколова О. Б., Руденко Л. М., Ківва Ф. В., Коваленко О. І. *Інформ. бюлетень АМН України* (додаток до Журналу Академії медичних наук України). 2007. Вип. 22. С. 73. *(Дисертант провів експериментальні дослідження, здійснив аналіз результатів, написав та оформив нововведення)*

44. Спосіб одночасного виявлення гемолітичної та лецитиназної активностей мікроорганізмів (АМ) [нововведення] / Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Бабич Є. М., Волянський Ю. Л., Калініченко С. В., Хворостяна В. О., Мізін В. В., Крестецька С. Л. *Інформ. бюлетень АМН України* (додаток до Журналу Академії медичних наук України). Київ, 2010. Вип. 27. С. 71–72. *(Дисертант провів експериментальні дослідження, здійснив аналіз результатів, написав та оформив нововведення)*

45. Спосіб визначення катаболічної активності мікроорганізмів : [нововведення] / Калініченко С. В., Бабич Є. М., Антушева Т. І., Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Білозерський В. І., Калініченко О. О. *Інформаційний бюлетень НАМН України* (додаток до Журналу Національної Академії медичних наук

України). 2013. Вип. 35. С. 85. (*Дисертант провів експериментальні дослідження, здійснив аналіз результатів, написав та оформив нововведення*)

46. Методи оцінки властивостей потенційних пробіотичних штамів лактобацил і біфідобактерій : [метод. реком.] / Співак М. Я., Бабич Є. М., Калініченко С. В., Лазаренко Л. М., Мокрозуб В. В., Коротких О. О., Антушева Т. І., Тимошок Н. О., Бабенко Л. П., Демченко О. А., Большакова Г. М., Демченко О. М., Шевчук В. О., Ганова Л. О., Жолобак Н. М. Київ, 2016. 27 с. (*Дисертант провів аналіз даних наукової літератури, розробив дизайн досліджень, написав текст МР*)

47. Методи пошуку перспективних штамів мікроорганізмів для розробки пробіотичних та метабіотичних препаратів : [метод. реком.] / Бабич Є. М., Калініченко С. В., Рижкова Т. А., Коротких О. О., Скляр А. І., Колесникова І. П., Маслій І. Г. Київ, 2016. 30 с. (*Дисертант провів аналіз даних наукової літератури, розробив дизайн досліджень, написав текст МР*)

48. Вплив умов культивування на біоплівкоутворення *Staphylococcus aureus* / Рижкова Т. А., Калініченко С. В., Коротких О. О., Ждамарова Л. А., Шикова О. А. XIII з'їзд товариства мікробіологів України : тези доп. (1-6 жовтня 2013 р.). Ялта, 2013. С. 319. (*Дисертант провів вивчення біоплівкоутворення S. aureus, аналіз одержаних результатів, написав текст тез*)

49. Коротких О. О., Калініченко С. В., Рижкова Т. А. Модуляція лецитиназної активності *Staphylococcus aureus* 209 P (АТСС 6538-P). *Актуальні питання теоретичної та практичної медицини* : збірник тез доповідей II Міжнародної наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених (16-18 квітня 2014 р.). Суми, 2014. С. 80–81. (*Дисертант провів вивчення лецитиназної активності S. aureus, аналіз одержаних результатів, написав текст тез*)

50. Аналіз ідентичності стафілококів, вилучених з лікувально-профілактичних закладів, за фаготипом / Антушева Т. О., Калініченко С. В., Антушева Т. І., Шакур О. А. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017 : Всеукраїнська наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжн. участю, присвячена дню науки* : тези доп. (11-12 травня 2017 р.). Запоріжжя, 2017. С. 5. (*Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез*)

51. Епідеміологічне типування клінічних штамів *Staphylococcus aureus* / Калініченко С. В., Коротких О. О., Антушева Т. І., Тимченко О. М., Антушева Т. О. *Медична наука та практика: актуальні питання взаємодії* : матеріали міжн. наук.-практ. конф. (31 червня-1 вересня 2018 р.). Київ, 2018. С. 73–76. (*Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез*)

52. Бабич Є. М., Калініченко С. В., Рижкова Т. А. Вплив дифтерійного екзотоксину на біологічні властивості грамнегативних бактерій. *Вклад молодих вчених в розвиток медичної науки і практики* : матеріали наук.-практ. конф. (13 листопада 2007 р.). Харків, 2007. С.5–6. (*Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез*)

53. Протимікробні властивості наноселену / Тимошок Н. О., Каплуненко В. Г., Харчук М. С., Калініченко С. В., Співак М. Я. *Мікробіологічні читання*

пам'яті професора Юрія Леонідовича Волянського : матеріали наук.-практ. конф. (12 лютого, 2020 р.). Харків, 2020. С. 51–52. (Дисертант провів вивчення біологічних властивостей штаму *L. plantarum* ІМВ В-7679)

54. Probiotic Lactobacteria for creation of selenium containing dietary supplement / Tymoshok N. O., Vitutyky V. S., Kharchuk M. S., Kharchyshyn V. M., Lazarenko L. M., Kalinichenko S. V., Spivak M. Ya. *Кластерні та наноструктурні матеріали* : мат. 6-ї Міжнародної конф. (5-6 жовтня 2020 року). Ужгород, 2020. С. 318–319. (Дисертант провів вивчення біологічних властивостей штаму *L. plantarum* ІМВ В-7679)

55. Активність плазмокоагулази клінічних штамів *Staphylococcus aureus* за умов впливу екзометаболітів лактобацил / Коротких О. О., Калініченко С. В., Бабич Є. М., Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Шкодовська Н. Ю., Балак О. К. *Наукові засади боротьби з інфекційними хворобами в Україні* : матеріали наук.-практ. конф., присвяченої щорічним «читанням» пам'яті академіка Л. В. Громашевського (8-9 жовтня 2014 р.). *Профілактична медицина*. Київ, 2014. № 3-4. С. 59–60. (Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез)

56. Коротких О. О., Калініченко С. В., Мішина М. М. Формування позаклітинних нейтрофільних пасток за впливу екзаметаболітів лактобацил. *Фармацевтична мікробіологія і клінічна лабораторна діагностика* : тези допов. наук.-практ. конф. (27-28 листопада 2014 р.). Харків, 2014. С. 42–44. (Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез)

57. Фракційний склад екзометаболітів *Lactobacillus plantarum*, отриманих за різних умов газового складу атмосфери культивування / Калініченко С. В., Коротких О. О., Бабич Є. М., Рижкова Т. А., Семенченко А. Ю., Антушева Т. І., Балак О. К. *Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями* : матеріали наук.-практ. конф. з участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 170-й річниці з дня народження І.І. Мечникова (15 травня 2015 р.). Харків, 2015. С. 106. (Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез)

58. Активність метаболітів пробіотичних штамів. Прогноз клінічного застосування / Скляр А. І., Калініченко С. В., Попов М. М., Мелентьєва Х. В., Торяник І. І., Попова Н. Г., Коротких О. О., Антушева Т. І. *Ювілейні терапевтичні читання. Клінічна та профілактична медицина: досвід та нові напрямки розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнародною участю. (11-12 квітня 2019 р.). Харків, 2019. С. 232. (Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез)

59. Калініченко С. В., Коротких О. О., Мані Ханс. Імунобіологічні препарати на основі мікробних адгезинів. *Медична наука та практика: виклики і сьогодення* : збірник тез наукових робіт учасників міжн. наук.-практ. конф. (24-25 серпня 2018). Львів, 2018. С. 88–92. (Дисертант здійснив аналіз одержаних результатів, написав текст тез)

60. Калініченко С. В. Стафілококові антиадгезини і метаболітні сполуки лактобацил як профілактичні засоби нового покоління. *Проблеми та стан*

розвитку медичної науки та практики в Україні : зб. матеріалів міжн. наук.-практ. конф. (12-13 червня 2020 р.). Дніпро, 2020. С. 111–115.

### АНОТАЦІЯ

**Калініченко С. В. Мікробіологічне обґрунтування нових підходів до подолання стафілококового носійства за допомогою лактобацил та поверхневих мікробних антигенів. – 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 теоретично обґрунтовано та розроблено кардинально новий підхід щодо удосконалення методів профілактики стафілококового бактеріоносійства та перешкодження персистенції стафілококів на слизових оболонках верхніх дихальних шляхів за допомогою поверхневих мікробних антигенів та лактобацил.

Запропоновано експериментальні зразки комбінованої кандидат-вакцини на основі поверхневих антигенів *S. aureus*, отриманих за допомогою фізичних методів, і штаму *L. plantarum* ІМВ В-7679, які володіють антиадгезивними і протиперсистентними властивостями, перешкоджають колонізації слизових оболонок носа *S. aureus* та стимулюють їх протиінфекційну резистентність.

**Ключові слова:** бактеріоносійство, поверхневі антигени *S. aureus*, *Lactobacillus* spp., фізичні чинники, комбінована протистафілококова вакцина, адгезія, колонізаційна резистентність.

### АННОТАЦИЯ

**Калиниченко С. В. Микробиологическое обоснование новых подходов к преодолению стафилококкового носительства с помощью лактобацилл и поверхностных микробных антигенов. - На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой 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 теоретически обоснован и разработан кардинально новый подход к усовершенствованию методов профилактики стафилококкового бактерионосительства и предотвращения персистенции стафилококков на слизистых оболочках верхних дыхательных путей с помощью поверхностных микробных антигенов и лактобацилл.

Предложены экспериментальные образцы комбинированной кандидат-вакцины на основе поверхностных антигенов *S. aureus*, полученных с помощью физических методов, и штамма *L. plantarum* ІМВ В-7679, обладающие антиадгезивными и противоперсистентными свойствами, препятствующие колонизации слизистых оболочек носа *S. aureus* и стимулирующие их противоифекционную резистентность.

**Ключевые слова:** бактерионосительство, поверхностные антигены *S. aureus*, *Lactobacillus* spp., физические факторы, комбинированная противостафилококковая вакцина, адгезия, колонизационная резистентность.

#### ANNOTATION

**Kalinichenko S. V. Microbiological substantiation of new approaches to overcoming staphylococcal carriage using lactobacilli and surface microbial antigens. – On the rights of the manuscript.**

Thesis for the Doctor of Medical Sciences degree in specialty 03.00.07 – Microbiology. – State Institution «I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine»». Kharkiv, 2021.

The dissertation theoretically substantiates and develops a radically new approach to improving methods of prevention of staphylococcal bacteriocarriers and prevention of persistence of staphylococcus on the mucous membranes of the upper respiratory tract.

It was found that the frequency of removal of members of the genus *Lactobacillus* spp. of the mucous membranes of the pharynx and nose in patients with ENT pathology and carriers was significantly lower compared with almost healthy individuals.

A number of experiments to study the effect of bacterial toxins (diphtheria exotoxin and lipopolysaccharides (LPS) *E. coli* 126) on the biological properties (growth, adhesive and anticomplementary) of gram-negative and gram-positive bacteria and buccal epithelium showed that diphtheria exotoxin (DE) inhibited the growth of gram-positive test cult, as LPS at a dose of 0,1 mg/ml, in contrast, stimulated the growth of *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* and *E. faecalis* ATCC 6783 and inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 25923. Bacterial toxins, regardless of dose, reduce by 1,3-1,5 ( $p < 0,05$ ) times the anticomplementary activity of test cultures, but do not affect their colonization ability.

Screening of biological properties of lactobacillus under different conditions of gas composition of the atmosphere genetic identification revealed a promising biotic domestic strain of *L. plantarum* IMB B-7679. The biological and molecular genetic properties of the strain of the author's team *Lactobacillus plantarum* IMB B-7679, its possibility of use as a domestic probiotic strain were studied.

Metabolites of lactobacilli obtained under conditions of reduced oxygen partial pressure had a significantly higher inhibitory capacity, 1,2-3,9 times ( $p < 0,05$ ) relative to the growth properties of test cultures of *S. aureus*.

The obtained cell-free supernatants (CS) samples have antiviral activity, inhibit the ability of test strains of *S. aureus* to colonize and biofilm, reduce their pathogenicity factors and at the same time stimulate the functional and metabolic activity of phagocytes.

The use of two physical factors (millimeter-wave electromagnetic waves and ultrasound) has yielded chemically unchanged *S. aureus* surface antigens with anticolonization properties that can be used as platforms to create a new class of non-injectable mucosal immunobiologicals.



The biochemical characteristics of the composition of CS, which are obtained under different conditions of the gas composition of the atmosphere, the cultivation of producers and cell-free antigenic complexes (CA), which are obtained by physical factors are given, their immunobiological properties and safety are studied. In *in vivo* studies, it has been shown that experimental samples of BS and the CA + Lac complex (mucosal candidate vaccine) are able to regulate the biocenoses of the mucous membranes upper respiratory tract in staphylococcal carriers and restore their anti-infective resistance. The immunobiological activity of experimental drugs was determined by long-term monitoring (90 days) of elimination of the pathogen from the mucous membranes of experimental animals.

The effectiveness of the intranasal non-injectable form for immunoprophylaxis/treatment of staphylococcal bacteria with simultaneous recovery of the mucosal microbiome and stimulation of local parts of the immune system has been experimentally proven.

**Key words:** bacteriocarriage, surface antigens *S. aureus*, *Lactobacillus* spp., physical factors, combined anti-staphylococcal vaccine, adhesion, colonization resistance.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

БА – бактеріальний безклітинний антиген  
БС – бактеріальний субстрат  
ВДШ – верхні дихальні шляхи  
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я  
ГГц – ГігаГерц  
ДСН-ПААГ-електрофорез – електрофорез в поліакріламідному гелі  
ДТ – дифтерійний токсин  
ЕМВ НЗВЧ – електромагнітне випромінення надзвичайно високої частоти  
ІАМ – індекс адгезії мікроорганізмів  
ІН – індекс імунної напруги  
ІФ – індекс фагоцитозу  
КА – коефіцієнт адгезії  
кГц – кілоГерц  
кДа – кілодальтон  
КУО – колоніє утворюючі одиниці  
КФ – коефіцієнт фагоцитозу  
ЛПС – ліпополісахарид  
мВт – міліват  
мг – міліграм  
мкг – мікрограм  
мл – мілілітр  
МО – міжнародні одиниці  
од. McF1 – одиниць за шкалою МакФарланд (MacFarland)  
ОЩ – оптична щільність  
ПАМС – патоген-асоційовані молекулярні структури  
ПФ – показник фагоцитозу  
см<sup>2</sup> – сантиметр квадратний  
СПА – середній показник адгезії  
ТХО – трихлороцтова кислота  
у.о. – умовних одиниць  
ФІ – фагоцитарний індекс  
ХР – хронічний риніт  
ХС – хронічний синусит  
ХТ – хронічний тонзиліт  
Ag – антиген  
Лас – лактобацили  
McF1 – МакФарланд (McFarland)  
RAPD-ПЛР – Random Amplification of Polymorphic DNA полімеразна ланцюгова реакція  
PNU – вміст білкового азоту  
sIgA – секреторний імуноглобулін А