

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО**

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ЛАВРИК ГАЛИНА СТЕФАНІВНА**

УДК: 579.864.017:579.26:[579.61:616-092].041/.042

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАЦИЛ**  
**ЗА ВЗАЄМОДІЇ З АВТОХТОННОЮ І ПАТОГЕННОЮ МІКРОБІОТОЮ**  
***IN VIVO* ТА *IN VITRO***

03.00.07- мікробіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ Лаврик Галина Стефанівна

Науковий керівник Корнійчук Олена Петрівна, д.м.н., професор

Львів – 2020

## АНОТАЦІЯ

Лаврик Г. С. Характеристика біологічних властивостей лактобацил за взаємодії з автохтонною і патогенною мікробіотою *in vivo* та *in vitro*. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 «Мікробіологія». - Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, 2020; Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, Одеса, 2020.

У дисертації викладено результати порівняльного дослідження біологічних властивостей індигенних лактобацил і встановлення характеру їхньої взаємодії із пробіотичними штамами та іншими мікроорганізмами.

Відповідно до даних наукової літератури відомо, що формування *Lactobacillus spp.* приепітеліальних мікробіоценозних біоплівкок створює потужний біологічний бар'єр, який попереджає колонізацію епітелію патогенними мікроорганізмами і забезпечує збереження власної мікробіоти у природних біотопах організму людини.

Особливу увагу привертають і умовно-патогенні бактерії, які, формуючи біоплівкову структуру, спричиняють запальні процеси, що важко піддаються лікуванню. Серед них стафілокок є основною причиною розвитку персистуючих хронічних гнійно-запальних інфекцій.

Для підвищення ефективності протимікробної терапії гнійно-запальних процесів, спричинених стафілококами, продовжується пошук засобів, які б дали змогу дезінтегрувати біоплівку для переведення патогена у планктонну форму. Антибактеріальна активність лактобацил зумовлена продукцією метаболітів, які можуть бути ефективними антагоністами проти біоплівкових форм патогенів.

Результати останніх досліджень диктують необхідність розробки нових принципів клінічного застосування живих мікроорганізмів для мінімального ризику побічних ефектів та підвищення ефективності корекції мікробіоти травного, вагінального трактів та ротоглотки пробіотиками з врахуванням взаємовідносин пробіотичних культур з індигенними лактобацилами людини.

У дисертаційній роботі вивчено видовий спектр лактобацилярної мікробіоти природних екосистем людського організму. Встановлено, що лактобацили виділяються у різних відсоткових частках у залежності від природної екосистеми: найбільший відсоток з ротоглотки (81,1 %), 62,5 % - з травного тракту і найменшу кількість - 45 % з вагіни. Встановлено домінування у всіх екологічних нішах виду *L. acidophilus* (30,3 %). Видовий спектр усіх біотопів включав *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum* і *L. rhamnosus*, лише *L. helveticus* (6,9 %) та *L. gasseri* (4,2 %) висівалися з вагінального тракту. У всіх екосистемах переважали гетероферментативні лактобацили. Зафіксовано дисоціацію штаму *L. rhamnosus* за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями за умов дисбіотичних змін.

Встановлено, що пробіотичні штами *L. plantarum* P17630, *L. acidophilus* KS 400, *L. plantarum* 8R-A3 спричиняють виражене пригнічення росту умовно-патогенних мікроорганізмів. *L. plantarum* 8R-A3 проявив найвищу антагоністичну активність відносно грамнегативних бактерій клінічних ізолятів *E. coli* та *P. aeruginosa*. Найвищу протигрибкову активність встановлено для *L. plantarum* P17630.

Лактобацили, виділені від практично здорових жінок, проявляють деяку антагоністичну активність лише відносно *C. albicans*, проте є неактивними у жінок з проявами вульвовагінального кандидозу. Відносно видів *C. non-albicans* антагонізму не виявлено.

Виявлено найвищі показники адгезивності до клітин людського організму для *L. acidophilus* ротоглотки ( $4,12 \pm 0,07$ ) та вагіни *L. plantarum* ( $4,36 \pm 0,22$ ). Найвищий показник адгезії для ізолятів травного тракту встановлено для виду *L. casei* ( $4,66 \pm 0,04$ ) відносно клітин букального епітелію. Індекс адгезивності лактобацил до людських еритроцитів I (0) групи крові є значно нижчим, ніж до букального епітелію.

Встановлено відмінності чутливості до протимікробних препаратів культур лактобацил, виділених з різних екосистем людського організму. Ротоглотковим ізолятам лактобацил властива чутливість до протимікробних

препаратів, яка характерна більшою мірою для грампозитивної мікробіоти, що заселяє зів, а частина кишкових ізолятів чутлива до препаратів (аміноглікозиди, тетрацикліни), які є активними, зазвичай, для представників ентеробактерій, що може бути непрямим свідченням міжвидового обміну генетичним матеріалом серед представників однієї екологічної ніші. Відмічено більш високі показники чутливості до фторхінолонів кишкових ізолятів лактобацил, порівняно із ротоглотковими. У 5,4% лактобацил встановлено чутливість до протигрибкових препаратів, зокрема клотримазолу.

У досліді *in vivo* за умов антибіотикоасоційованого дисбактеріозу відновлення вихідних значень лактобацил та біфідобактерій у складі мікробіоценозу кишечника було досягнуто лише у відновний період серед мишей, яким не згодовували біопрепарати (спонтанне відновлення) та за умов використання аутоштамів лактобацил. Процес відновлення нормобіоценозу серед тварин обох груп практично не відрізнявся. Використання для корекції мікробіоти пробіотичних штамів, а також згодовування суміші індигенних та пробіотичних штамів було недостатнім для досягнення кількісного рівня *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.* вихідних значень.

За допомогою інтерференційної (диференційно-інтерференційний контраст - DIC) мікроскопії з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії вперше досліджено здатність пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 (48-годинної монокультури) в умовах *in vitro* формувати біоплівку значної щільності -  $1,79 \pm 0,04$  од. Встановлено, що співвідношення клітин у зеленій/червоній ділянці спектру (життєздатних клітин до мертвих) становить 78/22 %, що забезпечує швидку колонізацію слизових оболонок організму людини, і зупиняє розвиток патологічного процесу, спричиненого стафілококами. У змішаній культурі молочнокислі бактерії здатні індукувати загибель біоплівкоутворювальних стафілококів, що показано при моделюванні біоплівки стафілококами, виділеними із гною пустул хворих на *acne vulgaris*. Визначальним фактором у клінічному перебігу вугрової хвороби є саме здатність бактерій до плівкоутворення.

За допомогою електронної мікроскопії виявлено незворотні ультраструктурні зміни біоплівкоутворювальних стафілококів під впливом пробіотичних штамів лактобацил, а у змішаних культурах з індигенними ізолятами лактобацил стафілококи набували здатності переходити у стан спокою. Вперше доведено, що у змішаній культурі молочнокислі бактерії здатні індукувати загибель стафілококів, які перебувають у біоплівковій формі, не переводячи її у планктонну.

Для підтвердження отриманих результатів (люмінесцентна та електронна мікроскопії) проводили контрольні посіви з біоплівок змішаних культур на поживне середовище, що дало змогу отримати ріст лактобацил (пробіотичних та індигенних ізолятів) на глюкозному агарі (1%) за аеробних умов.

Окрім спектрофотометричних, електронно- та флуоресцентно-мікроскопічних методів дослідження здатності до біоплівкоутворення, була використана полімеразна ланцюгова реакція для виявлення відповідних генів у стафілококів. Серед 27 ізолятів *S. aureus* нами виявлено наявність генів *icaA* у 35,71 % штамів, а ген *icaD* – 53,57 %.

При вивченні метаболічних факторів антагоністичної активності лактобацил встановлено індукцію інгібуючої дії нативних культур лактобацил на початку стаціонарної фази їхнього росту. Фільтрування надосадової рідини лактобацил призвело до різкого зниження їхньої активності, а при нейтралізації цієї рідини 2 н NaOH та каталазою не зафіксовано інгібування біоплівкоутворювальних стафілококів, що може бути свідченням прояву антагоністичних властивостей лише за функціональної активності живих клітин лактобацил.

Доповнено новими даними уявлення щодо видового спектра бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з різних екосистем людського організму, їхньої біологічної активності та антибіотикочутливості.

Зафіксовано дисоціацію за морфологічними та культуральними властивостями у культурах *L. rhamnosus*, що виділялися від осіб з ознаками дисбіотичних порушень, що супроводжувалась також незначною альтерацією

біохімічних властивостей (ферментація арабінози та незброджування мелецитози).

Вперше запропоновано використання для культивування і зберігання бактерій роду *Lactobacillus spp.* поживне середовище на основі ячмінного солоду.

Вперше встановлено взаємозв'язок між чутливістю до протимікробних препаратів ізолятів лактобацил та мікробіотою відповідно до ніш, які вони заселяють.

За умов антибіотико-асоційованого дисбактеріозу за результатами експериментального дослідження доведено більш високу ефективність застосування біокорегуючих препаратів для відновлення лактобацилярної мікробіоти в порівнянні з використанням аутоштамів лактобацил.

Вперше встановлено здатність пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro* до біоплівкоутворення, а також показано набуття здатності лактобацил (пробіотичних та індигенних ізолятів) до росту на глюкозному агарі (1%) за аеробних умов після виділення їх у змішаних культурах з біоплівкоутворювальними стафілококами.

Вперше показано зміни ультраструктури стафілококів, спричинені активністю пробіотичних штамів лактобацил, і доведено їх незворотність. Натомість індигенні лактобацили здатні лише індукувати перехід стафілококів у стан спокою. Доведено, що антагоністична активність лактобацил індукується біоплівкоутворювальними стафілококами.

Для лікування та профілактики інфекційних запальних процесів різної локалізації рекомендується включати пробіотичні препарати лактобацил (лактобактерин, гінофлор, гінолакт) у відповідності до їхнього видового складу, призначення та у залежності від їхньої протимікробної активності. Так, для лікування гнійно-запальних процесів, які спричиняються *S. aureus* та *P. aeruginosa*, можуть бути рекомендовані препарати, які містять *L. plantarum* 8R-A3. Високо ефективною при лікуванні ешерихіозів та патогенних процесів є *L. plantarum* 8R-A3. Для лікування вульвовагінальних кандидозів, спричинених

*C. albicans* та *C. non-albicans* рекомендовано препарати, які містять *L. plantarum* P17630.

У патогенезі *acne vulgaris* слід враховувати дисбіотичні порушення у інших екосистемах організму людини. З метою підвищення ефекту лікування *acne vulgaris* застосовувати як комбінування протимікробних хіміотерапевтичних препаратів з біопрепаратами лактобацил, так і комплексне лікування – внутрішнє застосування еубіотиків із засобами місцевої біотерапії.

**Ключові слова:** *Lactobacillus spp.*, біологічні властивості, пробіотичні штами, антагоністична активність, біоплівкоутворювальні стафілококи, *acne vulgaris*

## SUMMARY

*Lavryk G.S.* Characteristics of biological properties of lactobacilli based on *in vivo* and *in vitro* interaction with autochthonous and pathogenic microbiota. - Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for the Candidate of Biological Sciences degree (doctor of philosophy) according to a specialty 03.00.07 "Microbiology". - Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, 2020; Odessa I.I. Mechnikov National University, Odessa, 2020.

The dissertation is devoted to the results of a comparative study of the biological properties of indigenous lactobacilli and the assessment of the nature of their interaction with probiotic strains and other microorganisms.

According to the scientific literature, it is known that the formation of *Lactobacillus spp.* pre-epithelial microbiocenosis biofilms creates a powerful biobarrier that prevents colonization of the epithelium by pathogenic microorganisms and ensures the preservation of its own microbiota in the natural habitats of the human body.

Opportunistic bacteria, which can cause inflammatory processes that are difficult to treat while forming biofilm structure, are especially noteworthy. Among them, staphylococci are the main cause of persistent chronic purulent inflammatory infections.

In order to increase the effectiveness of antimicrobial therapy for diseases caused by staphylococci, the search continues for tools that would allow the disintegration of the biofilm to convert the pathogenic agent into planktonic form. The antibacterial activity of lactobacilli is associated with the production of metabolites that can be effective antagonists to biofilm forms of pathogens.

The results of recent studies point out the necessity of developing new principles of clinical use of live microorganisms to minimize the risk of side effects and increase the efficiency of the digestive, vaginal and oropharyngeal microbiota correction with probiotics while taking into account the relations between probiotic cultures and human indigenous lactobacilli.



The species spectrum of lactobacilli microbiota of the natural human body ecosystems has been studied. It was found that lactobacilli can be isolated in different percentages depending on the natural ecosystem - the largest percentage was isolated from the oropharynx (81.1%), from the digestive tract - 62.5%, and the smallest number (45%) from the vagina. Dominance in all ecological niches of *L. acidophilus* species was established (30.3%). The species spectrum of all habitats included *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, and *L. rhamnosus*. Only *L. helveticus* (6.9%) and *L. gasseri* (4.2%) were isolated from the vaginal tract. Heteroenzymatic lactobacilli predominated in all ecosystems. The dissociation of *L. rhamnosus* strain by morphological, cultural, and biochemical properties under conditions of dysbiotic changes was recorded.

It was revealed that probiotic strains of *L. plantarum* P17630, *L. acidophilus* KS 400, and *L. plantarum* 8R-A3 cause severe growth inhibition of opportunistic bacteria. *L. plantarum* 8R-A3 showed the highest antagonistic activity against gram-negative bacteria of clinical isolates of *E. coli* and *P. aeruginosa*. The highest antifungal activity was established for *L. plantarum* P17630.

Lactobacilli isolated from healthy women show some antagonistic activity only against *C. albicans*, but are inactive in women with vulvovaginal candidiasis. No antagonistic effects were found against *C. non-albicans* species.

The highest indicators of adhesion to human cells were found for *L. acidophilus* in the oropharynx ( $4.12 \pm 0.07$ ) and *L. plantarum* in the vagina ( $4.36 \pm 0.22$ ). The highest adhesion index for digestive tract isolates was found for *L. casei* ( $4.66 \pm 0.04$ ) in reference to buccal epithelial cells. The adhesion index of lactobacilli to human erythrocytes of blood group O is much lower than to the buccal epithelium.

Differences in sensitivity to antimicrobial drugs of lactobacilli cultures isolated from different ecosystems of the human body have been established. Oropharyngeal isolates of lactobacilli are characterized by sensitivity to antimicrobial drugs, which is more typical for the gram-positive microflora inhabiting the pharynx, and some intestinal isolates "borrowed" sensitivity to drugs (aminoglycosides, tetracyclines), which are usually active against representatives of enterobacteria. This can be an

indirect evidence of cross-species exchange of genetic material among representatives of one ecological niche. Higher sensitivity to fluoroquinolones of intestinal isolates of lactobacilli was noted in comparison with oropharyngeal ones. Sensitivity to antifungal drugs, in particular clotrimazole, was found in 5.4% of lactobacilli.

In an *in vivo* experiment under conditions of antibiotic-associated dysbacteriosis, recovery of lactobacilli and bifidobacteria baseline values in the intestinal microbiocenosis in the recovery period was achieved only among mice that were not fed with biologicals (spontaneous recovery) and under the use of autochthonous lactobacilli strains. The process of restoring the normal biocenosis among animals of both groups did not differ. The use of probiotic strains for microbiota correction, as well as the feeding with a mixture of indigenous and probiotic strains, was insufficient to achieve initial values of *Lactobacillus spp.* and *Bifidobacterium spp.*

The ability of the probiotic strain *L. plantarum* 8R-A3 (48-hour monoculture) to form a biofilm of significant density ( $1.79 \pm 0.04$  units) *in vitro* was studied for the first time by means of interference microscopy (differential interference contrast - DIC) using a darkfield condenser and fluorescence microscopy. It was found that the ratio of cells (viable cells to dead cells) in the green/red part of the spectrum is 78/22%, which provides rapid colonization of the human body mucous membranes and stops the development of the pathological process caused by staphylococci. In mixed culture, lactic acid bacteria are able to induce the death of biofilm-forming staphylococci, as shown in the biofilm modeling using staphylococci isolated from the pus of pustules in patients with *acne vulgaris*. The determining factor in the clinical course of acne is the ability of bacteria to form biofilms.

Electron microscopy revealed irreversible ultrastructural changes in biofilm-forming staphylococci under the influence of probiotic strains of lactobacilli, and in mixed cultures with indigenous isolates of lactobacilli, staphylococci acquired the ability to transfer into an inactive state. It has been proven for the first time that in a mixed culture, lactic acid bacteria are able to induce the death of staphylococci in biofilm form without converting it to planktonic.

To confirm the obtained results (luminescent and electron microscopy) control cultures from biofilms on a growth medium were performed, which allowed receiving growth of lactobacilli (probiotic and indigenous isolates) on glucose agar (1%) under aerobic conditions after their isolation from mixed cultures with biofilm-forming staphylococci.

In addition to spectrophotometric, electronic, and fluorescence microscopic methods for the study of biofilms, detection of *icaA* and *icaD* genes in staphylococci was performed using the polymerase chain reaction. Among the 27 isolates of *S. aureus*, there was detected the presence of *icaA* genes in 35.71% of strains, and the *icaD* gene in 53.57%.

In the study of metabolic factors of antagonistic activity of lactobacilli, the induction of inhibitory action of lactobacilli native cultures at the beginning of the stationary phase of their growth was established. Filtration of the lactobacilli supernatant led to a sharp decrease in their activity, and when neutralizing this fluid with 2n NaOH and catalase, no inhibition of biofilm-forming staphylococci was recorded.

New data on the species spectrum of bacteria of the genus *Lactobacillus* isolated from different ecosystems of the human body, their biological activity, and antibiotic sensitivity has been obtained.

The difference in morphological and cultural properties was recorded in cultures of *L. rhamnosus* isolated from individuals with signs of dysbiotic disorders, which was also accompanied by a slight alteration of biochemical properties (fermentation of arabinose and absence of fermentation of melezitose).

The use of nutrient medium based on barley malt for cultivation and storage of *Lactobacillus spp.* was proposed for the first time.

The correlation between antimicrobial susceptibility of lactobacilli isolates and the microbiota according to the niches they inhabit has been established for the first time.

The results of an experimental study under the conditions of antibiotic-associated dysbacteriosis proved the higher efficiency of the use of biocorrective drugs

to restore the lactobacilli microbiota in comparison with the use of autochthonous lactobacilli strains.

The ability of probiotic strain of *L. plantarum* 8R-A3 to form biofilms *in vitro* was established for the first time, and the ability of lactobacilli (probiotic and indigenous isolates) to grow on glucose agar (1%) under aerobic conditions after their isolation from mixed cultures with biofilm-forming staphylococci was shown.

Changes in the ultrastructure of staphylococci caused by the activity of probiotic strains of lactobacilli have been shown for the first time, and their irreversibility has been proved. In contrast, indigenous lactobacilli can only induce the transition of staphylococci into an inactive state. It is proved that the antagonistic activity of lactobacilli is induced by biofilm-forming staphylococci.

For treatment and prevention of infectious inflammatory processes of different localization, it is recommended to include lactobacillus probiotics (lactobacterin, ginoflor, ginolact) in accordance with their species composition, purpose and depending on their antimicrobial activity. Thus, for the treatment of purulent inflammatory processes caused by *S. aureus* and *P. aeruginosa*, preparations containing *L. plantarum* 8R-A3 may be recommended. *L. plantarum* 8R-A3 is also highly effective in the treatment of colibacillosis and pathogenic processes. For the treatment of vulvovaginal candidiasis caused by *C. albicans* and *C. non-albicans*, preparations containing *L. plantarum* P17630 are recommended.

When determining the pathogenesis of acne vulgaris one should take into account dysbiotic disorders in other ecosystems of the human body. In order to increase the acne vulgaris treatment response, both combination of antimicrobial chemotherapeutic drugs with lactobacilli preparations and complex treatment like internal use of eubiotics with topical biotherapy should be considered.

**Key words:** *Lactobacillus spp.*, biological properties, probiotics, antagonism, biofilm-forming staphylococci, *acne vulgaris*.

### Наукові статті у фахових виданнях

1. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М. Характеристика чутливості до антибактерійних препаратів лактобактерій, ізольованих з різних екологічних ніш. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2009. № 4. С. 68-73. *(Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію бактерій роду Lactobacillus spp., встановлено чутливість до антимікробних препаратів, статистичну обробку матеріалу, підготовлено статтю до друку)*.
2. Видовий спектр і антибіотикочутливість лактобактерій та грибів роду *Candida*, виділених з вагіни практично здорових жінок / І. В. Тимчук, Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, О. В. Кулик. *Biomed. Biosoc. Anthropol.* 2012. № 18. С. 91-95. *(Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію бактерій роду Lactobacillus spp., встановлено чутливість до антимікробних препаратів, статистичну обробку матеріалу, підготовлено статтю до друку)*.
3. Антагоністичні властивості лактобактерій, виділених з вагіни, відносно умовно-патогенної мікрофлори / Г. С. Лаврик, І. В. Тимчук, О. П. Корнійчук, Л. П. Костюк. *Biomed. Biosoc. Anthropol.* 2014. № 22. С. 99-103. *(Дисертантом сплановано і виконано експеримент, проведено аналіз наукової літератури та отриманих результатів, підготовлено статтю до друку)*.
4. Лаврик Г. С. Характеристика адгезивних властивостей лактобацил - клінічних ізолятів та складників біопрепаратів. *Аннали Мечниковського інституту*. 2015. № 2. С. 200-203. *(Дисертантом сплановано і виконано експеримент, опрацьовано дані літератури, проведено узагальнення результатів, підготовлено статтю до друку)*.
5. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Чувствительность к химиотерапевтическим противомикробным препаратам планктонных и биопленочных форм стафилококков. *Современные тенденции развития науки и технологий : сборник научных трудов по материалам VIII Международной научно- практической конференции, 30 ноября 2015 г. Белгород, 2015. С. 99-105. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, встановлено чутливість до антимікробних препаратів, статистичну обробку матеріалу, підготовлено статтю до друку)*.

6. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Біоплівкова форма стафілококів у моно- та бівидовій культурі в поєднанні з лактобацилами. *Біологічні Студії/Studia Biologica*. 2015. Т. 9, № 3. С. 89-98. (Дисертантом сплановано і виконано експеримент, опрацьовано дані літератури, проведено узагальнення результатів, підготовлено статтю до друку).
7. Лаврик Г. С. Біосумісність індигенних та пробіотичних штамів лактобактерій в експерименті. *Світ медицини та біології*. 2016. Т. 12, № 2. С. 124-128. (Дисертантом проведено експериментальну частину по створенню антибіотико-асоційованого дисбактеріозу у мишей, опрацьовано дані літератури, облік результатів експерименту, підготовлено статтю до друку).
8. Lavryk G., Korniyuchuk O., Tymkiv M. Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli. *Regulatory Mechanisms Biosystems*. 2017. Vol. 8, № 1. P. 98-103. (Дисертантом проведено забір клінічного матеріалу, виділення та ідентифікація мікроорганізмів, експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку матеріалу, огляд літератури, підготовлено статтю до друку).
9. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М. Альтерація морфологічної структури стафілококів за культивування у змішаній культурі з лактобацилами (за даними електронно-мікроскопічного дослідження). *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2016. № 4. С. 28-32. (Дисертантом проведено забір клінічного матеріалу, виділення та ідентифікація мікроорганізмів, експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку матеріалу, огляд літератури, підготовлено статтю до друку).
10. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Антимікробна активність лактобацил відносно стафілококів, виділених з біоплівок хворих *asne vulgaris*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2020. № 1. С. 69-79. (Дисертантом сплановано і виконано експеримент, опрацьовано дані літератури, проведено узагальнення результатів, підготовлено статтю до друку).

### Тези доповідей та матеріали конференцій, з'їздів

11. Лаврик Г. С., Тимчук І. В., Корнійчук О. П. Видовий спектр та чутливість до антимикробних препаратів лактобацил, виділених з вагіни практично здорових жінок. *XIII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського: тези доповідей*, 1-6 жовтня 2013р. м. Ялта. Ялта, 2013. С. 277.
12. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Адгезивні властивості лактобацил, виділених з різних біотопів людського організму. *Довкілля і здоров'я : збірник матеріалів науково-практичної конференції*, 23 квітня 2015р. м. Тернопіль. Тернопіль, 2015. С. 122-123.
13. Адгезивні властивості лактобацил / Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М., Тимчук І. В. *Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу: збірник наукових праць щорічної науково-практичної конференції з міжнародною участю*, 21-22 травня 2015р. м. Львів. Львів, 2015. С. 124-126.
14. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Деструктуючий вплив лактобактерій на біоплівкову форму стафілококів. *Досягнення та перспективи розвитку мікробіології: програма та тези доповідей міжнародної наукової конференції*, 12-14 жовтня 2016 р., м. Львів. Львів, 2016. С. 85-87.

### Патенти:

15. Патент на корисну модель 100849 Україна, МПК С 12 N 1/20. Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / Лаврик Г. С., Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. № у 2015 02085 ; заявл. 10.03.15 ; опубл. 10.08.2015, Бюл. №15.
16. Патент на корисну модель 100850 Україна, МПК С 12 N 1/04. Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / Лаврик Г. С., Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. № у 2015 02087 ; заявл. 10.03.15 ; опубл. 10.08.2015, Бюл. № 15.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ВНР - відфільтровані надосадові рідини
- ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота
- ІАМ - індекс адгезивності мікроорганізму
- К - коефіцієнт участі епітеліальних клітин та еритроцитів в адгезії
- КЛЖК - коротколанцюгові жирні кислоти
- КУО/г чи КУО/мл - колонієутворююча одиниця/г чи мл.
- НБК - нативні бактеріальні культури
- НС - нейтралізований супернатант
- ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція
- РНК - рибонуклеїнова кислота
- СПА - середній показник адгезії
- ТЕМ - трансмісійна електронна мікроскопія
- ТТ - травний тракт
- ФНП- $\alpha$  - фактор некрозу пухлин  $\alpha$
- ФБР - фосфатний буферний розчин
- ЦНС - центральна нервова система
- DIS - диференційно-інтерференційний контраст
- MRS - середовище Мана, Рогози, Шарпа (de Man,Rogosa,Sharpe)
- IgA - імуноглобулін А
- IL - інтерлейкіни
- Th - Т-хелпери
- PI - пропідіум йодид
- PIA - екзополісахаридний міжклітинний адгезин (Polysaccharide Intercellular Adhesin)
- p53 - білок 53, фактор транскрипції
- QS - відчуття кворуму (Quorum Sensing)
- ZO - цитоплазматичні білки щільних контактів (zonula occludens)



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	16
<b>ВСТУП.....</b>	<b>20</b>
<b>РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....</b>	<b>28</b>
1.1. Роль і місце лактобацил в мікробіоценозах .....	28
1.2. Лактобацили як нормосимбіонти травного, вагінального трактів і ротоглотки.....	31
1.3.Сучасні уявлення про мікроекологічні порушення, причини і наслідки.....	39
1.4.Пробіотичні препарати як основа профілактики і корекції дисбіотичних порушень.....	41
1.5.Причини недостатньої ефективності пробіотичних препаратів.....	49
<b>РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень.....</b>	<b>53</b>
2.1. Об'єм проведених досліджень.....	53
2.2. Мікробіологічні методи дослідження.....	54
2.2.1. Виділення та ідентифікація лактобацил.....	55
2.2.2. Визначення антагоністичної активності лактобацил.....	55
2.2.3. Визначення адгезивних властивостей лактобацил.....	56
2.2.4. Дослідження чутливості лактобацил до протимікробних препаратів.....	57
2.3. Визначення складу мікробіоти кишечника мишей за умов антибіотико-асоційованого дисбіозу.....	58
2.4. Методи дослідження біоплівкоутворення <i>in vitro</i> у лактобацил та стафілококів.....	59
2.4.1. Дослідження життєздатності бактерій у структурі біоплівки.....	60
2.4.2. Дослідження ультраструктурної будови бактерій у складі біоплівки.....	61
2.5. Визначення генів біоплівкоутворення, <i>icaA</i> та <i>ica D</i> , у стафілококів за допомогою ПЛР .....	62
2.6. Дослідження бактеріоцидної активності лактобацил за допомогою методу дифузії в агар.....	63
2.7.Статистична обробка результатів дослідження.....	63

**РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ. Характеристика індигенних лактобацил травного, урогенітального трактів і ротоглотки та лактобацил – складників пробіотичних препаратів.....65**

3.1. Частота висівання та видовий спектр лактобацил травного, урогенітального трактів та ротоглотки практично здорових осіб.....65

3.2. Біологічні властивості індигенних штамів лактобацил в порівнянні з властивостями пробіотичних штамів.....71

3.2.1. Морфотинкторіальні, культуральні та ферментативні властивості.....71

3.2.2. Антагоністична активність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил.....75

3.2.2.1. Антагоністична активність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил відносно грибів роду *Candida*.....75

3.2.2.2. Антагоністична активність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил щодо умовно-патогенної бактеріальної мікробіоти.....80

3.2.3. Адгезивність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил.....84

3.2.4. Чутливість до протимікробних препаратів індигенних ізолятів лактобацил та лактобацил - складників біопрепаратів.....88

**РОЗДІЛ 4. Взаємодія індигенних штамів лактобацил із штамами лактобацил – складників еубіотиків - *in vivo* .....97**

**РОЗДІЛ 5. Активність лактобацил відносно планктонної та біоплівкової форми стафілококів.....105**

5.1. Формування біоплівки індигенними та пробіотичними штамами лактобацил.....105

5.2. Моделювання біоплівки при сумісному культивуванні у змішаних культурах лактобацил та стафілококів.....108

5.3. Вплив лактобацил на ультраструктуру біоплівкоутворювальних стафілококів (за даними електронно-мікроскопічного дослідження).....115

<b>РОЗДІЛ 6. Антимікробна активність лактобацил відносно біоплівкоутворювальних стафілококів <i>in vitro</i>, виділених від хворих на <i>asne vulgaris</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>РОЗДІЛ 7. Аналіз та узагальнення одержаних результатів.....</b>	<b>127</b>
ВИСНОВКИ.....	151
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	154
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	155
ДОДАТОК.....	187

## ВСТУП

### Актуальність теми

Останніми десятиліттями на тлі розвитку мікроекології як важливої наукової галузі медицини та біології значно розширюються і подекуди переглядаються питання функціональної значущості та взаємодії з макроорганізмом нормальної мікробіоти організму людини. Біоценози всіх біотопів нерозривно пов'язані між собою і зміни в одному з біоценозів закономірно поширюється на всі локуси мікроекологічної системи [1, 2], що є результатом природного відбору під час коєволюції між мікробною спільнотою і людським організмом [3, 4].

Фізіологічно цінним, облігатним компонентом різних екосистем людського організму (травного, уrogenітального трактів та ротоглотки) є лактобацили. Спектр функцій лактобацил різноманітний: біосинтетична (продукція органічних кислот, перекису водню, лізоциму, бактеріоцинів, біосурфактантів, багатоатомних спиртів, газів) [5, 6], колонізаційна (конкуренція за лімітовані поживні субстрати та сайти адгезії з патогенами), ферментативна (метаболізм білків, жирів, вуглеводів, жовчних кислот, гормонів), імуномодуюча, детоксикаційна, моторна та ін. [7, 8].

Формування *Lactobacillus spp.* приепітеліальних мікробіоценозних біоплівки створює потужний біологічний бар'єр, який попереджає колонізацію епітелію патогенними мікроорганізмами і забезпечує збереження власної мікробіоти в природних біотопах організму людини [9].

Особливу увагу привертають і умовно-патогенні бактерії, які, формуючи біоплівкову структуру, спричиняють запальні процеси, що важко піддаються лікуванню. Серед них стафілокок є основною причиною розвитку персистуючих, хронічних гнійно-запальних інфекцій [10, 11].

Одним із способів підвищення ефективності протимікробної терапії захворювань, спричинених стафілококами, є застосування засобів, які б дали змогу дезінтегрувати біоплівку для переведення патогена у планктонну форму.

Для цього застосовують мікроорганізми-антагоністи у складі еубіотичних препаратів, зокрема, лактобацили [12].

Останніми роками спостерігається ріст захворювань, що супроводжуються дисбіотичними змінами. Спектр захворювань досить широкий - від аутоімунних і запальних захворювань травного тракту, підшлункової залози, нирок, печінки до анемії, метаболічного синдрому та сепсису. Дисбіози сприяють розвитку цукрового діабету, алергічних та шкірних захворювань [13-25]. При цьому в кишковому і вагінальному біотопах помітно знижується популяційний рівень індигенних цукролітичних бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* [26, 27].

Впродовж останніх десятиліть фармацевтичний ринок України значно поповнився широким асортиментом біопрепаратів – різних за складом та призначенням. Нові дані щодо несумісності [28] екзогенних штамів бактерійних препаратів з автохтонною мікробіотою стали підґрунтям для дослідження даного аспекту.

Результати останніх досліджень диктують необхідність розробки нових принципів клінічного застосування живих мікроорганізмів для мінімального ризику побічних ефектів та підвищення ефективності корекції мікробіоти травного, вагінального трактів та ротоглотки пробіотиками з врахуванням взаємовідносин пробіотичних культур з індигенними лактобацилами людини.

Тому дослідження взаємодії і впливу лактобацил на інші бактерії є важливим для обґрунтування та розробки комплексної антимікробної терапії.

### **Зв'язок роботи з державними і галузевими науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота є фрагментом запланованих науково-дослідних робіт кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького за темами: «Розробка диференційованої тактики лікування і профілактики моно- та поліорганної недостатності в ургентній

абдомінальній хірургії» № державної реєстрації: 0110U002149, шифр: ІН.2100.0002.10. (2010-2014 рр.), «Обґрунтування моніторингу діагностики, стратегія профілактики та стандартизація методів лікування кровотеч (шлунково-кишковий тракт) № державної реєстрації: 0115U000042, шифр: ІН.21.00.001.15. (2015-2019 рр.) та фінансованої теми з державного бюджету України «Скринінг вторинних метаболітів стрептоміцетів, активних щодо полірезистентних збудників нозокомінальних інфекцій» (2018-2020 рр.).

Автор дисертації виконувала фрагменти перерахованих тем, які стосуються теми дисертаційного дослідження.

*Тема дисертації затверджена* на засіданні Вченої Ради медичного факультету №2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького від 17.03.2010 р. (протокол № 4) та на засіданні Проблемної комісії «Вірусологія, мікробіологія » МОЗ та НАМН України (протокол № 119 від 06.11.2010 р.). Тема відкоригована на засіданні Вченої Ради медичного факультету №2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 1 від 18.09.2019 р.).

### **Мета і завдання дослідження**

*Мета дослідження* - порівняльна характеристика біологічних властивостей лактобацил - ізолятів різних екосистем організму людини - і встановлення характеру їхньої взаємодії із мікробними чинниками за умов запального процесу та індигенними та пробіотичними штамами лактобацил.

Для досягнення вказаної мети поставлено такі завдання:

1. Встановити видовий спектр лактобацил – нормосимбіонтів природних екосистем людського організму – травного, уrogenітального трактів та ротоглотки.

2. Встановити біологічні властивості лактобацил, що входять до складу мікробіоценозів організму людини (ступінь резистентності до протимікробних

хіміотерапевтичних препаратів, адгезивні властивості та антагоністична активність).

3. Встановити характер взаємодії індигенних лактобацил із штамми лактобацил - складників еубіотиків *in vivo* (за умов антибіотикоасоційованого дисбіозу).

4. Встановити здатність лактобацил формувати біоплівкові структури *in vitro*.

5. Встановити характер взаємодії лактобацил і стафілококів у змішаних плівкоутворювальних культурах та виявити ультраструктурні зміни в клітинах вказаних систем.

6. Розробити заходи з підвищення ефективності біокорегуючої терапії з урахуванням видового складу лактобацилярних компонентів біопрепаратів.

*Об'єкт дослідження:* лактобацилярна мікробіота травного, урогенітального трактів і ротоглотки практично здорових осіб та її роль у формуванні відповідних мікробіоценозів та шляхів їх стабілізації за умов дисбіотичних змін.

*Предмет дослідження:* біологічні властивості бактерій роду *Lactobacillus* та характер взаємодії аутохтонної лактобацилярної мікробіоти із пробіотичними штамми лактобацил та мікроорганізмами - чинниками запального процесу.

**Методи дослідження:** *мікробіологічні* - виділення, ідентифікація та визначення біологічних властивостей мікросимбіонтів людського організму (мікроскопічні, культуральні, біохімічні властивості досліджуваних ізолятів лактобацил; вивчення антагоністичної активності та адгезії; визначення чутливості до протимікробних препаратів; *спектрофотометричні, електронно-та флуоресцентно-мікроскопічні* (дослідження біоплівок); *біологічні* – експериментальне моделювання антибіотикоасоційованого дисбактеріозу у мишей та вивчення динаміки відновлення мікробіоти кишечника; *статистичні* дослідження.

## Наукова новизна одержаних результатів

Доповнено новими даними уявлення щодо видового спектра бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з різних екосистем людського організму, їхньої біологічної активності, та антитбіотикочутливості.

Зафіксовано дисоціацію за морфологічними та культуральними властивостями у культурах *L. rhamnosus*, що виділялися від осіб з ознаками дисбіотичних порушень, що супроводжувалась також незначною альтерацією біохімічних властивостей (ферментація арабінози та незбродження меліцитози).

Вперше запропоновано використання для культивування і зберігання бактерій роду *Lactobacillus* поживне середовище на основі ячмінного солоду.

Вперше встановлено взаємозв'язок між чутливістю до протимікробних препаратів ізолятів лактобацил та мікробіотою відповідно до ніш, які вони заселяють.

За умов антибіотикоасоційованого дисбактеріозу за результатами експериментального дослідження доведено більш високу ефективність застосування біокорегуючих препаратів для відновлення лактобацилярної мікробіоти в порівнянні з використанням аутоштамів лактобацил.

Вперше встановлено здатність пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro* до плівкоутворення, а також показано набуття здатності лактобацил до росту на глюкозному агарі (1%) за аеробних умов після виділення їх у змішаних культурах з біоплівкоутворювальними стафілококами.

Вперше показано зміни ультраструктури стафілококів, спричинені активністю пробіотичних штамів лактобацил, і доведено їх незворотність. Натомість індигенні лактобацили здатні лише індукувати перехід стафілококів у стан спокою. Доведено, що антагоністична активність лактобацил індукується біоплівкоутворювальними стафілококами.



## Практичне значення одержаних результатів

Отримані дані дали змогу диференційовано охарактеризувати спектр лактобацилярної нормосимбіотичної мікробіоти відповідно до функціональної активності у природних біосистемах організму людини.

Визначено чутливість лактобацил до протимікробних препаратів та доцільність застосування відповідних еубіотиків у залежності від їх складу, призначення та від протимікробного засобу при проведенні відповідної антимікробної терапії. Доцільно включати пробіотичні штами лактобацил у засоби місцевого застосування при лікуванні вугрової хвороби.

Встановлено підвищення ефективності лікування *acne vulgaris* за умов комбінування медикаментозного лікування та біокорекції із застосуванням препаратів лактобацил, що дає змогу оптимізувати схему лікування і зменшити навантаження антимікробними хіміотерапевтичними засобами.

### *Впровадження у практику*

За результатами роботи розроблено два патенти на корисну модель «Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus*» (патент України № 100849 від 10.08.2015р.), «Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus*» (патент України № 100850 від 10.08.2015р.).

Результати дослідження впроваджені у наукову роботу кафедр вищих медичних навчальних закладів України: Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Буковинського державного медичного університету, Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

## **Особистий внесок здобувача**

Автором дисертаційної роботи самостійно проведено патентно-інформаційне дослідження, проаналізувано наукову літературу за обраною темою. Дисертантом особисто сформульовано мету, завдання та методи дослідження. Забір матеріалу, формування груп для досліджень, планування та проведення експериментів автором здійснено самостійно.

Особисто проведено статистичну обробку і аналіз отриманих результатів, їхню інтерпретацію з використанням даних наукової літератури. Формулювання висновків та практичних рекомендацій проведено з участю наукового керівника. Самостійно проведено підготовку матеріалів та оформлення дисертації.

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

## **Апробація результатів дисертації**

Результати та основні наукові положення дисертаційної роботи було представлено, обговорено та позитивно оцінено на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу» (Львів, 2013, 2015 рр.); XIII з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (Ялта, 2013): міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів» (Вінниця, 2014 року); науково-практичній конференції «Довкілля та здоров'я» (Тернопіль, 2015); VIII международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2015); міжнародній науковій конференції «Досягнення та перспективи розвитку мікробіології» (Львів, 2016).

Дисертація апробована на спільному засіданні кафедри мікробіології, науково-дослідного інституту епідеміології та гігієни Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

### **Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць (2 - одноосібно). Серед них 10 статей у провідних наукових фахових виданнях України рекомендованих ДАК України (2 статті опубліковані у журналах, які представлені в Web of Science, 2 статті в журналі з індексом Scopus, 2 статті в журналі з індексом РІНЦ), 2 патенти України на корисну модель, 4 тез у матеріалах міжнародних з'їздів та науково-практичних конференцій.

### **Обсяг і структура дисертації**

Робота викладена на 189 сторінках комп'ютерного тексту та складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел містить 333 (з них 254 іноземних авторів). Матеріали дисертації ілюстровані 10 таблицями та 43 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Роль і місце лактобацил в мікробіоценозах

Протягом останніх десятиліть стало зрозуміло, що людський організм живе в тісній гармонії зі складною екосистемою, що складається з понад 1000 різних видів бактерій, що заселяють ротову порожнину, верхні дихальні шляхи, травний канал, піхву та шкіру. Ця мікробіотична спільнота, передається відразу після народження і зберігається протягом усього життя [29, 30].

Результати нещодавніх метагеномних та інших високопродуктивних досліджень стали підґрунтям до формування нового уявлення про структуру, функції та динаміку людського мікробіома, сумарного терміну для людських мікробів та їхніх геномів [31-33].

Специфіка розселення різних мікробних популяцій у відповідних біотопах макроорганізму корелює зі сформованими в них умовами для проживання мікроорганізмів. Найбільш густо заселеною екосистемою є кишечник, в якому сконцентровано близько 60% мікробіоти людини, 15-16% мікроорганізмів знаходиться в ротоглотці, 15-20% мікробних популяцій заселяє шкірні покриви, у вагінальному біотопі жінок міститься 9-10% мікробіоти [34]. Деякі з них містять складні мікробні спільноти, які не є планктонними, але мають структури більш високого порядку, так звані біоплівки, мікробні популяції, вбудовані в складні, мимовільні полімерні матриці, які прилягають один до одного, а також поверхні або інтерфейси [35, 36].

Соціальні системи мікробних спільнот, які ми називаємо QS-системою (QuorumSensing — відчуття кворума), глобальна регуляція забезпечує як формування біоплівки, так і посилення бактеріальної адгезії, початок синтезу факторів, асоційованих з антагоністичною активністю для представників індигенної мікробіоти і проявом патогенності для умовно-патогенної, тощо [37].

В бактеріях QS заснований на синтезі і секреції низькомолекулярних дифундуючих гормоноподібних молекул, які називають автоіндукторами, що при досягненні певної щільності популяції бактерій взаємодіють із спеціальними рецепторними білками і запускають транскрипцію цільових генів [38].

Спільнота організовує єдину генетичну систему у вигляді плазмід - кільцевих ДНК, що несуть поведінковий код для членів біоплівки, що визначають їхні трофічні, енергетичні та інші зв'язки між собою та зовнішнім світом. Мікробіота кожної конкретної людини індивідуально специфічна, генетично детермінована і, вірогідно, успадкована [39].

Патогенні мікроорганізми, які формують біоплівки, демонструють іншу поведінку, ніж планктонні клітини, і, таким чином, більш стійкі до традиційних методів лікування за допомогою протимікробних препаратів, що дозволяє їм легко ухилитися від контролю імунної системи господаря [40, 41]. У бактеріальних патогенів молекули QS зв'язуються зі спорідненими рецепторами, які після активації прямо чи непрямо контролюють експресію генів-мішеней, що кодують фактори вірулентності [42].

Відомо, що непатогенні бактерії, коменсали людини, також формують складні міжвидові співтовариства (спільноти) - мікробіоценози шкіри, кишечника, слизових [43, 44].

Важливими симбіонтами і учасником різних екосистем людського організму є лактобацили [6, 45]. Колонізація відповідних біотопів представниками роду *Lactobacillus* починається з адгезії окремих клітин на щільній поверхні, зокрема прикріплення до клітин макроорганізму, та утворення біоплівки [45]. Тобто мікробіота кишечника або шкіри на відповідних поверхнях організму людини формує гігантську біоплівку, яка складається з окремих мікроколоній мікроорганізмів та відповідного матриксу (екзополісахаридів або інших сполук мікробного походження, які необхідні для утворення даної структури) [46].

Для ефективних колонізації та персистенції або адаптації до зміни умов лактобацили найчастіше використовують двокомпонентну систему, що

складається з асоційованого з мембраною білка – гістидин-кінази для взаємодії з сигналами від навколишнього оточення клітини і цитоплазматичного регулятора відповіді, який модулює роботу специфічних генів [47].

Механізм QS регулює продукцію бактеріоцинів молочнокислими бактеріями за допомогою секреції бактеріоциноподібних пептидних феромонів [48]. Цікаво, що молекули-QS представників роду *Lactobacillus*, що контролюють продукцію бактеріоцинів, активуються у відповідь на інфекцію [49]. Відомо, що QS-молекули представників роду *Lactobacillus* втягуються в боротьбу з вірулентністю бактеріальних патогенів як *in vitro*, так і *in vivo* [50].

Jones and Versalovic [51] продемонстрували, що штами *L. reuteri*, виділені з різних екологічних ніш (наприклад, грудне молоко людини, фекалії і порожнина рота), утворюють біоплівки і можуть продукувати протимікробний агент (reuterin), який має про- або протизапальну дію [52].

Найбільшою групою мікроорганізмів мікробіому людини є їхня популяція у травному каналі [53]. Разом із шаром слизу, sIgA сапрофітна мікробіота утворює надепітеліальний захисний шар, що безпосередньо контактує з епітелієм кишечника. Причому біоплівку утворює як індигенна мікробіота, так і патогенні мікроорганізми. Під час розвитку інфекційного процесу вони взаємодіють на конкурентній основі. Тому в одних випадках стимулюється апоптоз, в інших — протекторні та регенеративні властивості [54, 55].

Відомо, що клітини епітелію кишечника постійно оновлюються і за 3–5 днів мігрують від крипт до кінчиків ворсинок. А продукти мікробної плівки здатні діяти на процеси мітозу, впливаючи таким чином на бар'єрну функцію кишкової стінки. У безпосередньому контакті з епітелієм знаходиться анаеробна мікробіота. У вищих шарах знаходяться більш толерантні до кисню мікроорганізми (факультативні анаероби та аероби) [54]. Процес оновлення епітелію супроводжується активізацією імунної системи та підтримує постійно стан її «боєготовності» [56].

Доведено, що *L. reuteri*, на основі якого створено різні пробіотичні препарати, може знищувати патогенні бактерії, зокрема *Gardnerella vaginalis* під час бактеріального вагінозу та відновлювати природну біоплівку вагінального тракту жінок [51, 57]. Відповідно, плівкоподібні спільноти травного та вагінального трактів, що містять корисні лактобацили, можуть мати захисну роль. Натомість, біоплівки або зв'язані структуровані мікробні асоціації в порожнині рота і дихальних шляхів добре охарактеризовані і пов'язані з респіраторними інфекціями, карієсом і періодонтитом [51]. У складі біоплівки умовно-патогенні бактерії набувають ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та інших факторів довкілля. Сьогодні відомо, що серед усіх інфекційних захворювань близько 65-80% викликають бактерії, які формують біоплівки [58].

Очевидним стає застосування молекулярно-генетичних підходів для розуміння непростих взаємовідносин у складі мікробіоти в системі мікроорганізм-мікроорганізм та мікроорганізм-хазяїн [59].

## **1.2. Лактобацили як нормосимбіонти травного та вагінального трактів і ротоглотки**

З сучасних позицій мікробіом людини складається зі спільнот симбіотичних, синантропних (коменсальних) і патогенних бактерій (а також грибів і вірусів), кластери яких перебувають в унікальних, комплементарних поєднаннях і населяють всі частини людського організму: шкіру, статеві органи, кон'юнктиву, слизові оболонки рото- і носоглотки та кишечник [33].

Великомасштабні дослідження мікробіома людини лягли в основу проектів Human Microbiome Project [60] і MetaHit [53], концепція яких полягає у розробці підходів вивчення мікроорганізмів *in situ* шляхом секвенування 16S рибосомного РНК-гена (16S) філогенетичного і таксономічного маркера для ідентифікації членів мікробних спільнот та у аналізі змін мікробного складу під впливом різноманітних чинників [61].

Мікроби колонізують не лише всі поверхні, але і тканини, органи, котрі раніше вважали стерильними - грудне молоко, плаценту [62, 63].

Виконуючи «генетичну функцію» нормобіота здійснює постійний обмін генетичним матеріалом між клітинами людини, представниками нормальної мікробіоти і патогенними видами, що потрапляють в ту або іншу екологічну нішу [64, 65]. В результаті такого обміну мікроорганізми набувають рецепторів і інших антигенів клітин хазяїна, що робить їх «своїми» для імунної системи і визначає відносну стабільність індигенної флори кожної людини, а відтак досягається імунологічна толерантність мікробіоти і організму хазяїна [66].

Хоча здорові біоценози людей характеризуються спектром певних загальних закономірностей, абсолютно ідентичних мікробних систем не існує. Кожен індивідуум характеризується своїм мікробним фенотипом [26].

#### *Лактобацили як нормосимбіонти травного тракту*

Нормобіоценоз ТТ характеризується складною бактеріальною екосистемою, яка при взаємодії з кишечним епітелієм виконує різноманітні біологічні функції [67].

Популяція кишкової мікробіоти містить близько  $10^{13-14}$  бактерій і більш ніж 1000 видів мікроорганізмів [68]. Склад нормальної мікробіоти кожного біотопу травного тракту (порожнина рота, стравохід, шлунок, дванадцятипала, тонка і товста кишки) різний і специфічний [69]. Динамічна рівновага мікробіоти ТТ зумовлена дуже тонкою збалансованою взаємодією між клітинами травної системи, мікробною флорою і імунною системою [70], що є важливим для фізіології ТТ.

Протеолітичні (гнилісні) мікроорганізми (кишкова паличка, бактероїди, протей, клостридії, псевдомонади) розщеплюють білки та амінокислоти з утворенням широкого спектру токсичних речовин, таких як аміак, аміни та ін., багато з яких сприяють розвитку діареї, запалення, мають канцерогенні властивості. Цукролітичні мікроорганізми (біфідобактерії, лактобацили, лактококи, пропіоновокислі бактерії та ін.) метаболізують вуглеводи до коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) [71].



Синтез КЛЖК є важливим чинником резистентності колонізації, що забезпечує стабільність складу кишкової мікробіоти, підтримку оптимальних значень рН на рівні 4,0 в просвіті товстої кишки, завдяки чому в ТТ гальмується зростання і розмноження патогенних і гнилісних мікроорганізмів [72, 73]. КЛЖК забезпечують більше 10 % потреби в енергії [16, 74], сприяють росту ентероцитів і контролюють їхню проліферацію і диференціювання, стимулюють кровопостачання слизових оболонок, утворення слизу [75], впливають на моторику кишечника [16, 74], загоєння ран і модуляцію запалення [75], регулюють апоптоз і володіють антиканцерогенним ефектом [76].

Із фекаліями відділяється переважно просвітна мікробіоти. Пристінкова мікробіота більш стабільна, представлена, в основному, біфідобактеріями і лактобацилами. Мікроби розташовуються у вигляді мікроколоній, захищених від зовнішніх впливів біоплівкою, що складається з секрету келихоподібних клітин (муцина) і екзополісахаридів мікробного походження та перешкоджають penetрації слизової оболонки товстої кишки патогенними і умовно-патогенними бактеріями, конкуруючи з останніми за зв'язок з епітеліальноклітинними рецепторами [77]. В дистальних відділах тонкої кишки збільшується бактеріальна щільність мікробіоти, причому пристінкова мікробіота переважає порожнинну, а кількість аеробних і анаеробних бактерій стає однаковою [78].

Багато чинників довкілля, такі як мікробіота материнського кишечника, імунітет господаря, використання антибіотиків, стрес і дієта, можуть викликати зміни у складі мікробіоти кишечника у людей і тварин [79]. Навіть у однойцевих близнят збігаються лише 50–80% видів бактерій мікробіоти кишечника [80].

Багато учених вважають, що можливість визначення єдиного стандарту складу мікробіоти кишечника практично відсутня [81].

Існує перехресний взаємозв'язок між кишковою мікробіотою і імунною системою організму людини за допомогою стимулюючого оновлення на епітеліальні клітини, а також спеціалізовані М-клітини і клітини *lamina propria* [81, 82].

Деякі бактерії (*E. coli*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) збільшують виживання ентероцитів за рахунок інгібування активації проапоптотичного шляху епітеліальних клітин, пов'язаного з патогенними бактеріями [83] та регулюють розвиток судинної системи ворсинок кишечника [84].

Доведено, що кишкова мікробіота спільно з кишечним епітелієм забезпечує першу лінію захисту від чужерідних антигенів [85], а саме бере участь в активації імунних реакцій і формуванні імунної толерантності макроорганізму [86]. Ефективність роботи кишково-асоційованої лімфоїдної тканини кишечника (GALT)-системи залежить від заселення кишечника індигенною мікробіотою. Двома головними системами рецепторів, що є патерн-розпізнавальними, здатних розпізнавати патогенні і непатогенні бактерії, є родина Toll- та NOD-подібних рецепторів (TLRs). TLRs ідентифіковані на антигенпрезентуючих клітинах (інтестинальні епітеліальні клітини, клітини Панета, макрофаги, дендритні клітини і моноцити) [7, 87].

В результаті багаточисельних досліджень на гнотобіонтах, було виявлено, що постійне стимулювання імунної системи кишечника нормальною мікробіотою вкрай важливе для дозрівання і нормального функціонування імунітету, а також для формування імунної толерантності до антигенів індигенної мікробіоти та їжі [88].

За останні десятиліття з використанням підходів метагеноміки і метаболоміки виявили складний взаємозв'язок між метаболізмом і мікробіотою ссавців [89, 90]. Дослідниками аргументовано, що фенотип ожиріння визначається кишковою мікробіотою [91], коли мікробіота хворої на ожиріння людини трансплантується худій гнотобіологічній миші, тварина набирає вагу швидшими темпами, ніж миша, контрольної групи при споживанні такого ж раціону [92].

В експериментах на тваринах показано, що різні типи психологічного стресу впливають на склад мікробіоти як у дорослих особин, так і в період новонародженості. При відлученні від матері новонароджених гризунів відзначається зменшення вмісту лактобацил, що супроводжується тривогою,

підвищенням ризику опортуністичних інфекцій та схильністю до прискорення перистальтики [93].

У моделях на тваринах продемонстровано, що за відсутності нормальної кишкової мікробіоти обмін серотоніну в ЦНС порушується, і це носить практично незворотний характер [94].

Мікробіота може впливати не тільки безпосередньо на системи органів людини, але й віддалено. Десятиліття досліджень продемонстрували, що склад мікробіоти тісно пов'язаний із змінами в здоров'ї людини, і що в деяких випадках склад мікробіоти може напряду впливати на якість здоров'я. Розвиток усе більш досконалих інструментів для визначення таксономії, функцій синтетичної здатності мікробіоти сприяло виявленню тісних асоціацій між мікробіотою і здоров'ям всього організму [95].

#### *Лактобацили як нормосимбіонти вагінального тракту*

На тлі урбанізації людського суспільства і наростаючих екологічних проблем, в еру антибіотиків і в умовах дії інших факторів, відбуваються значні зміни в еволюційно сформованих мікробіоценозах людського організму. Як наслідок цього процесу можна розглядати зростаючу роль умовно-патогенних мікроорганізмів при інфекційних захворюваннях, в тому числі і при акушерській патології [26].

Нормоценоз жіночої сечостатевої системи – це стан мікробіоценозу, що характеризується абсолютним домінуванням лактобацил та низьким титром умовно-патогенних мікроорганізмів, який має важливе значення для здоров'я жінки [96]. Від загальної кількості вагінальної мікробіоти 97% займає група анаеробних цукролітичних бактерій групи *Doderlein*. Анаероби переважають аероби в співвідношенні 10:1. Лактобацили представлені як анаеробами, так і мікроаерофілами, їхня концентрація у вагінальному секреті здорових жінок сягає до  $10^{8-9}$  колонієутворюючих одиниць (КУО) / мл. Серед них найчастіше виділяють види: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii* [97].

Обов'язковою передумовою розмноження лакто- і біфідобацилярної флори є достатня кількість глікогену поверхневих клітин епітелію вагіни, що визначається рівнем естрогену в організмі жінки. Глікоген метаболізується до молочної кислоти з утворенням спиртів і перекису водню, що визначає кисле середовище рН вагіни 4,0-5,0. Існує прямий зв'язок між кількістю глікогену і продукцією молочної кислоти [98]. З моменту активізації функції яєчників (у зв'язку з накопиченням в організмі дівчат власних естрогенів), спостерігається потовщення вагінального епітелію і збільшення в ньому концентрації глікогену, який в свою чергу стимулює проліферацію молочнокислих бактерій. Від цього часу бактерії групи *Doderlein* стають домінантними протягом всього репродуктивного періоду здорової жінки. Естрогенозалежний механізм регуляції мікроекологічного стану у піхві призводить до зміни умов існування різних груп мікроорганізмів у різні фази менструального циклу. Особливо високий ризик дисбіотичних порушень під час менструації, коли вагінальний секрет стає лужним, а концентрація глікогену знижується, що негативно впливає на кількість і активність індигенної флори [97].

Основна роль у підтриманні колонізаційної резистентності вагінального тракту відведена лактобацилам [99]. Лактобацили стають бар'єром для алохтонних мікроорганізмів, попереджаючи їхню адгезію до епітеліальних клітин і продукують різні речовини з бактерицидною і фунгіцидною дією. Антагоністичні властивості лактобацил забезпечуються органічними кислотами, які знижують рН вагінального секрету, продукцією перекису водню, бактеріоциноподібними субстанціями і біосурфактантами [100]. Бактеріоцини лактобацил інгібують ріст і розмноження бацил, клостридій, сахароміцетів, стрептококів, стафілококів, ентеробактерій, псевдомонад, лістерій, грибів роду *Candida* [101].

Механізм контролю мікробіоти піхви лактобацили здійснюють шляхом впливу на різні ланки імунної системи, регулюючи неспецифічний і специфічний клітинний і гуморальний імунітет [102]. Внаслідок природної загибелі і подальшого розпаду бактеріальних клітин — представників нормальної

мікробіоти піхви, компоненти їх стінок (мураміддипептид, ліпополісахариди та ін.), впливаючи на систему місцевого імунітету, стимулюють гуморальну та клітинну його ланки [101].

Біологічне різноманіття мікробіоти сечостатевої системи може порушуватись у відповідь на зміни місцевого і загального імунітету, на дію несприятливих зовнішніх факторів, після хіміотерапевтичних заходів, при інфекційних та соматичних захворюваннях [96]. Відомо, що зміни у стані мікробіоценозу виявляються у розмноженні умовно-патогенних мікроорганізмів. Заселення ними певних біотопів не є типовим, що призводить в свою чергу до зниження кількості лактобацил та інших представників мікробіоти піхви та навіть до повного їхнього зникнення [103].

Гінекологічна практика вказує на певну непередбачуваність наслідків перенесених вагінітів, молочниць та дисбіозів сечостатевої системи, що змушує більш детально вивчати процес розвитку дисбіотичних явищ [104]. Дослідження мікробіома людини показали, що різні види *Lactobacillus* є переважаючими, але й взаємовиключними в піхві [32]. Вагінальний мікробіом здорових жінок репродуктивного віку складається з спільнот з низькою мікробною різноманітністю в кожному індивідуумі і між різними суб'єктами на рівні роду [105].

#### *Лактобацили як нормосимбіонти ротоглотки*

Ротоглотка за щільністю мікробного обсіменіння займає друге місце після товстої кишки. В 1 мл слини міститься  $10^8$ - $10^9$  клітин різноманітних мікроорганізмів, а в зішкрябі з гінгиви - до  $10^{12}$  КУО / мл. Ротова порожнина, ротоглотка і гортань утворює кордон між зовнішнім середовищем, нижніми дихальними шляхами і шлунково-кишковим трактом [106]. Ротоглотка і ротова порожнина вистелені багат шаровим плоским незроговілим епітелієм і є частиною як дихального, так і шлунково-кишкового трактів [107].

У порожнині рота виявлено понад 700 різних видів бактерій [108], більшість з яких є анаеробними [109]. Індигенна мікробіота ротоглотки

представлена численними видами аеробних і анаеробних мікроорганізмів, серед яких в нормі визначаються лактобацили, стрептококи, біфідобактерії, пропіоновокислі бактерії, бактероїди, актиноміцети, дріжджоподібні гриби та інші. Більшість цих бактерій колонізують певну ділянку: задню частину язика, тверде піднебіння або зубні поверхні [110]. Проте, деякі бактеріальні групи, наприклад, різні види стрептококів, *Prevotella* і *Lactobacillus* ростуть на багатьох ділянках і зустрічаються у більшості людей [111].

Лактобацили порожнини рота можуть відрізнятися між різними біотопами в роті, а слина містить суміш лактобацил з різних ніш. Види лактобацил, виявлені в слині, можуть варіювати, але *L. rhamnosus*, *L. paracasei* і *L. fermentum* визнані постійними [112, 113]. Лактобацили (*L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/paracasei*) часто зустрічаються при каріозних ураженнях і вважаються одними з основних каріогенних бактеріальних груп [111].

На поверхнях слизових оболонок щільність колонізації лактобацилами є меншою, але *L. plantarum*, *L. rhamnosus* і *L. fermentum* можуть поширюватися на поверхню язика [114], а *L. rhamnosus* також на слизову оболонку ясен [115].

Безпосередньо після народження шкірні, кишкові, носоглоткові і ротглоткові мікробні спільноти не диференціюються і колонізуються бактеріальними видами, що відображають режим потрапляння: у фізіологічно народжених дітей *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* і *Sneathia* є переважаючими родами, тоді як у немовлят, народжених шляхом кесаревого розтину, спочатку спостерігаються типові мешканці шкіри, такі як стафілококи [116]. Незрілість імунної системи хазяїна допускає толерування цих вихідних колоністів при відсутності явної запальної відповіді; замість цього ранній мікробний вплив вважається життєво важливим для послідовного розвитку імунної системи [117], що, в свою чергу, сприяє місцевій локалізації бактерій на більш пізній стадії шляхом відбору.

Отже в ротовій порожнині і верхніх дихальних шляхах відбувається динамічна взаємодія як між коменсалами, так і потенційними бактеріями, що викликають хвороби. Збалансований мікробіом призводить до прямої або

імунної опосередкованої резистентності до колонізації, яка сприяє стійкості до інвазії і поширенню патогенів [118].

### **1.3. Сучасні уявлення про мікроекологічні порушення, причини і наслідки**

Нормальний мікробіоценоз характеризується стабільністю, проте є чутливим до дії багатьох дестабілізуючих факторів в умовах перевищення сили їх впливу на компенсаторні можливості мікробної екосистеми [56]. Дисбіотичні порушення у ротовій порожнині, верхніх дихальних шляхах, шкірі корелюють з кишковим дисбіозом. Це вказує на тісний взаємозв'язок окремих мікробних систем людини, що утворюють єдиний мікроекологічний орган, який функціонує завдяки складним і різноманітним механізмам регуляції. Центральне місце в регуляції взаємовідносин на рівні біотоп-загальна мікросистема, займає біоценоз товстого кишечника, який концентрує найбільшу кількість індигенної мікробіоти (біля 60%) і виконує ширший спектр фізіологічних функцій. Також існує певний зв'язок і між таксономічним складом окремих біотопів. Незважаючи на різницю у спектрі мікроорганізмів, що заселяють різні порожнинні органи (що зумовлено неідентичними умовами для життєдіяльності), окремі найбільш фізіологічні види зустрічаються в кожному біотопі, тобто можна припустити наявність певних механізмів обміну мікробіотою між окремими біотопами в межах загальної мікробної екологічної системи [120].

Незважаючи на суттєвий прорив у вивченні біоценозу, на сьогодні залишається безліч невирішених питань і протиріч. На даний час немає єдиного терміну, що позначає порушення нормального біоценозу кишечника. Звиклий і зрозумілий для клініцистів термін „дисбактеріоз кишечника” відсутній у міжнародних посібниках. В іноземній літературі зустрічаються такі визначення, як ”синдром надлишкового росту кишкової мікробіоти” (bacterial overgrowth) [121], „синдром сліпої петлі”, „синдром експансії мікробного росту” і автори трактують їх, як порушення мікробіоти лише тонкої кишки. Ці твердження зовсім не еквівалентні визначенню «дисбактеріоз», під яким ми історично

розуміємо зміни мікробного пейзажу як тонкої, так і товстої кишки [122]. Отже, дисбіоз (дисбактеріоз) - порушення еубіозу, що виражається у розвитку мікроекологічних розладів у різних біотопах, які асоціюються зі змінами нормального складу та функцій ендогенної мікробіоти [1, 2].

На думку деяких науковців, дисбактеріоз (не лише кишечника, але й інших нестерильних порожнин і трактів) розглядається як зміна мікробіоценозів різних біотопів людського організму, що виражається в порушенні інфраструктурного відношення «анаероби/аероби», популяційних змінах чисельності і складу мікробних видів біотопів, у тому числі появи нерезидентних для даного біотопу видів (контамінація, транслокація), зміні їхньої метаболічної активності, що є наслідком та/або одним із патогенетичних механізмів багатьох патологічних станів [123]

Домінантна роль в формуванні належить порушенню популяційного рівня біфідо- і лактобацил. При розвитку мікроекологічних та імунних порушень в організмі, селективну перевагу набувають умовно-патогенні мікроби, серед яких виявляються клони, що несуть гени лікарської стійкості і генетичні детермінанти так званих „островів” патогенності, асоційовані з адгезивними, цитотоксичними і ентеротоксичними властивостями бактерій [124].

Постійна дія на живі організми протимікробних, протипухлинних та ін. препаратів, технологічних харчових добавок, промислових отрут, пестицидів, радіонуклідів, стресових агентів іншої природи веде до порушення симбіотичної мікроекологічної системи, що супроводжується різними екологічними і соціальними небажаними наслідками (розповсюдження антибіотикорезистентних штамів, селекція мікроорганізмів з атиповими властивостями, формування нових мікробних спільнот, зміна фармакокінетики і біотрансформації ліків та нутрієнтів, зниження ефективності хіміотерапії і хіміопрофілактики, розширення спектру захворювань, зв'язаних з мікробним фактором, збільшення числа осіб зі зниженою стійкістю до інфекцій і т.д.) [120].



Нещодавно було висловлено припущення, що лікування антибіотиками в ранньому дитячому віці значно збільшує ризик розвитку запальних захворювань кишечника в зрілому віці, ожиріння та інших метаболічних розладів [125].

Спектр захворювань, що викликають розвиток дисбіозу кишечника досить широкий: аутоімунні і запальні захворювання ТТ (синдром подразненої кишки, псевдомембранозний коліт, хвороба Крона, виразковий коліт) [13-15], рак товстої і прямої кишки [17, 82, 126, 127], захворювання підшлункової залози, нирок і печінки, анемія на підставі дефіциту фолієвої кислоти, розлади перистальтики, метаболічний синдром, сепсис [16, 18-20, 67, 128], цукровий діабет [21], бронхіальна астма [25], алергічні захворювання і інші патології [22, 24].

Супроводжуючи багато хвороб та станів, дисбіози в комплексі терапії основного захворювання завжди потребують діагностики та корекції [52].

#### **1.4. Пробиотичні препарати як основа для профілактики і корекції дисбіотичних порушень**

Найбільш визнаними біокоректорами нормобіоценозів до теперішнього часу, безперечно, залишаються пробіотики, які здійснюють позитивний вплив на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму господаря через стабілізацію та оптимізацію функції його нормальної мікробіоти, а також підвищення протиінфекційної стійкості організму [129].

Особливий інтерес у дослідників викликає роль пробіотиків як «промоторів життя» під час ери антибіотиків. На сьогодні, в умовах зростаючої резистентності мікроорганізмів, пробіотики доцільно розглядати не як антоніми антибіотиків, а як синергісти і протектори гомеостазу людського організму на тлі необхідної антимікробної терапії [130].

Молочнокислі бактерії залишаються найбільш використовуваними в біотехнології мікроорганізмів, і завдяки своїй вираженій антагоністичній активності широко застосовуються закваски у харчовій промисловості та як пробіотики для лікування, профілактики багатьох інфекційних і гнійно-

запальних хвороб. Більшість пробіотичних мікроорганізмів належать до роду *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* [131], що застосовуються орально, інтравектально та інтравагінально як окремо, так і в комбінації один з одним [132].

Шляхи впливу пробіотиків на популяції мікробіоти та її функціональну активність, багаточисельні. Механізм пробіотичного ефекту, виявляється як в прямій дії на патогенні бактерії та на діяльність коменсальної мікробіоти, так і непрямій - на епітелій слизової оболонки травного тракту (збільшення продукції слизу, підтримка цілісності молекулярноклітинного бар'єру тощо) [54, 55, 133].

По суті усі близькі фізичні контакти між господарем і мікроорганізмом відбуваються на епітеліальних слизових оболонках [134]. Цей фізичний бар'єр, що складається з щільно прилягаючих одна до одної епітеліальних клітин, і визначає міру кишкової проникності і є важливим чинником збереження цілісності епітеліального бар'єру. До спеціальних інтегральних білків, що утворюють так звану «зону злипання» між плазматичними мембранами двох контактуючих клітин, відносять ZO-1 (zonula occludens), ZO-2, клаудин-5, окклюдин [135]. Було показано, що *L. acidophilus* запобігає порушенню розподілу Zo-1 і окклюдина *E. coli* і підсилює цитоскелетні щільні структури білка, такі як окклюдин і актин в кишкових епітеліальних клітинах [136, 137]. Цікаво, що деякі пробіотичні штами *Bifidobacterium infantis* і *L. plantarum* володіють здатністю підсилювати бар'єрну функцію кишечника шляхом зміни експресії генів і розподілу окклюдина, Zo-1, Zo-2 і інших ізоформ клаудина [134].

Вказане підтримує імунну толерантність, знижуючи вірогідність транслокації бактерій через слизову оболонку кишечника, що сприяє секреції слизу, продукуванню дефенсинів і синтезу білків при запальних захворюваннях кишечника і синдромі подразненої товстої кишки [131, 138, 139]. Відомо, що муцин інгібує бактерійну транслокацію, а дослідження з *L. casei* LGG показали підвищені рівні експресії муцинових генів в моделі культур Caco-2 [140, 141]. Показано, що експресія генів муцина, що індукуються лактобацилами, залежить

від прямого клітинного контакту між *L. plantarum* і кишковими епітеліальними клітинами [141].

Здатність лактобацил до адгезії дозволяє їм конкурувати з патогенними бактеріями за рецептори, які експресуються на епітеліальних клітинах кишечника, тим самим захищаючи їх від пошкоджень, викликаних патогенними бактеріями, і зберігати цілісність бар'єру. Показано, що *L. rhamnosus* R0011 і *L. acidophilus* R0052 інгібують інфекцію кишкових клітин, викликану дією *E. coli*, перешкоджаючи адгезії бактерій на них і цитоскелетним перебудовам епітелію [142].

Бактерії, які продукують молочну кислоту, зменшують як життєздатність, так і вірулентність *E. coli* O157: H7 [143] і інших діарейних *E. coli*, відтак зменшується колонізація, що запобігає виникненню інфекції [144].

Іншими важливими властивостями, пов'язаними із позитивним ефектом пробіотиків, є автоагрегація і коагрегація, що визначають накопичення бактерій одного і того ж виду, так і різних видів відповідно [145], що є передумовою для колонізації і персистенції в шлунково-кишковому тракті та спільної агрегації, яка є бар'єром для запобігання колонізації поверхні кишечника патогенними мікроорганізмами [146]. Було висловлено припущення, що клітинна агрегація може сприяти колонізації лактобацил в шлунково-кишковому тракті або вагінальному тракті [147, 148]. Але для того, щоб отримати позитивний ефект, пробіотики повинні досягти в кишечнику адекватної біомаси за рахунок росту, утворення або агрегації біоплівки, і тому здатність до агрегації є бажаною властивістю пробіотиків [148].

Швидкодійний механізм дії пробіотиків полягає в прямому впливі на мікроорганізми за рахунок синтезу бактеріоцинів (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substances), біосурфактантів і продуктів первинної і вторинної ферментації [131, 149]. Ген-кодований характер синтезу бактеріоцинів на рибосомах робить їх легко податливими для біоінженерії або для збільшення їхньої активності, або для визначення мішені-бактерії. Завдяки цій особливості бактеріоцинів, антибактеріальна терапія є менш руйнівною для нормальної

мікробіоти кишечника, що є основним недоліком звичайного використання антибіотиків [150].

Було показано, що сильна антимікробна активність *L. rhamnosus* GG проти *S. enterica serovar typhimurium* зумовлена накопиченням молочної кислоти [176]. Окрім зниження рН, молочна кислота діє як пермеабілізатор грамнегативної зовнішньої мембрани бактерій, що дає змогу іншим сполукам діяти з нею синергічно [152]. Дійсно, в експерименті *in vitro* відбувається загибель *S. typhimurium* під впливом *L. johnsonii* NCC 533 та інших штамів

*L. johnsonii*, які продукують перекис водню [153] і ефект посилюється в присутності мембранопроникаючої молочної кислоти [42, 147].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, який продукують лактобацили, може безпосередньо пошкоджувати епітелій [154] і викликати загибель клітин інших бактерій [153]. Накопичення H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> може сприяти підтримці нормальної і гомеостатичної мікробіоти. Лактобацили, які входять до складу вагінальної мікробіоти, за рахунок H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> захищають жіночий організм від розвитку бактеріального вагінозу [155] і інших захворювань, що передаються статевим шляхом, і передчасних пологів [156]. Було висловлено припущення, що H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> може вносити вклад в протизапальну дію коменсальних і пробіотичних бактерій через його вплив на рецептор PPAR-γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), який відіграє центральну роль в регуляції запалення кишечника і гомеостазу [157].

Останніми роками викликає інтерес здатність окремих кислоторезистентних лактобацил проліферувати в шлунку і конкурувати з *Helicobacter pylori* [158].

Однією із основних і добре вивчених властивостей пробіотичних штамів лактобацил є їхня потенційна імунорегуляторна активність [159]. Продемонстровано, що деякі пробіотичні організми можуть модулювати експресію про- та протизапальних молекул, а саме індукувати продукування IL-10 і IL-12, оскільки баланс IL-10 / IL-12, що виділяється макрофагами і дендритними клітинами дендритними клітинами за індукуючої активності

мікроорганізмів, має вирішальне значення для визначення характеру імунної відповіді [160].

Ряд досліджень демонструють важливу роль пробіотиків у визначенні балансу Th1/Th2 [161].

Кисломолочні бактерії *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. casei* та *L. rhamnosus* GG, інгібують Th2 імунну відповідь, суттєво зменшують продукцію ІЛ-4 та ІЛ-5 мононуклеарними клітинами периферійної крові [159].

У 2015 були опубліковані результати першого дослідження *in vitro* дослідження здатності пробіотиків змінювати експресію пухлинних медіаторів [17]. Вплив *L. acidophilus* на культури клітин виявився у здатності пригнічувати продукцію пухлинних біомаркерів - достовірне зниження продукції p53, ІЛ-18 та ФНП- $\alpha$ . Встановлено, що *L. acidophilus* можуть блокувати рецептори адгезії, підвищувати рівень ІgА в слизовій, посилювати продукцію білків щільних контактів, виділяти бактеріоцини, обмежувати бактеріальну транслокацію, збільшувати бар'єрну функцію епітелію [17, 162].

Усі потенційні пробіотичні штами *Lactobacillus* унікальні і їхні позитивні ефекти специфічні для кожного штаму і не можуть екстраполюватись на інші штами роду *Lactobacillus* і навіть штами, що належать до тих самих видів і підвидів [42, 144, 148, 163]. Крім того, встановлено, що комбінація специфічних пробіотичних штамів потенціює позитивні ефекти на макроорганізм в порівнянні з пробіотичними штамами поокремо [163]. Ефекти після прийому пробіотиків можуть бути як локальними, обмеженими стимуляцією кишкового імунітету, так і системними [164].

За результатами кількох досліджень встановлено, що інактивовані мікроорганізми теж позитивно впливають на здоров'я людини [165]. Пряма взаємодія з господарем може бути опосередкована бактеріальними клітинами незалежно від їхньої життєздатності і заснована на здатності клітин людини розпізнавати специфічні бактеріальні компоненти або продукти [166]. Встановлено, що інактивовані штами лактобацил (зокрема, клітини *Lactobacillus salivarius* UCC118) зберігають протизапальні властивості життєздатних клітин.

Виходячи з отриманих даних, автори дійшли до висновку, що імуномодулюючі властивості не є результатом адгезії до епітеліальних клітин або продукуванням бактеріоцинів [167]. Зростання інтересу до нежиттєздатних мікроорганізмів або екстрактів мікробних клітин викликане проблемами із зберіганням пробіотиків і ризиками мікробної транслокації і інфекції для споживача [168]. З цією метою дослідники пропонують використовувати термін «парапробіотик», який означає «нежиттєздатні мікробні клітини (інтактні або зламані) або неочищені клітинні екстракти (тобто зі складним хімічним складом), які при введенні (перорально або місцево) в достатніх кількостях приносять користь споживачеві або тварині» [169]. Найкращі результати використання пробіотиків отримано при лікуванні і профілактиці кишкових інфекцій і постантибіотичних синдромів. У кількох метааналізах була встановлена ефективність деяких лактобацил при гострій інфекційній діареї і профілактиці діареї, пов'язаної з антибіотиками [170], *Clostridium difficile*-асоційованій діареї [171] та у попередженні некротизуючого ентероколіту у недоношених новонароджених [172].

Пробіотичні штами лактобацил застосовують у профілактиці та лікуванні урогенітальних захворювань, зокрема бактеріального вагінозу у жінок [173], профілактиці atopічних захворювань і харчової гіперчутливості [174], профілактиці карієсу зубів [175].

Таким чином, пробіотичні лактобацили за високий рівень безпеки, визнані «загальновизнаними безпечними» бактеріями [59].

Дослідження показали, що лікування з застосуванням препаратів на основі представників роду *Lactobacillus* зменшує накопичення жиру і прозапальних цитокінів у жировій тканині [176].

Зовсім новою сферою застосування пробіотиків стали захворювання нервової системи [177]. Пробіотики, здатні полегшувати захворювання нервової системи (депресію, хронічну втому, стан стривоженості), називаються психобіотиками [178]. Вплив створюється за допомогою синтезу нейротрансмітерів, КЛЖК, антиоксидантів та ін. В результаті в організмі

господаря змінюється рівень метаболізму нейротрансмітерів, а в мозку - активність певних ділянок, та знижується рівень гормонів стресу в крові [179].

Існує багато доказів щодо доцільності застосування пробіотиків для лікування респіраторних захворювань, включаючи астму та інші стани гіперчутливості дихальних шляхів [180]. Нещодавно у штамів *L. rhamnosus* і *L. gasseri* виявлено антидіабетичні і протитуберкульозні ефекти на мишах, які отримували дієту з високим вмістом жирів або сахарози [181].

Зокрема, досліджують вплив дисбіотичних станів і терапії як *in vivo*, так і *in vitro*, пробіотиками на процеси розвитку таких патологічних станів, як ожиріння, гіперхолестеринемія, ішемічна хвороба серця, гіпергомоцистеїнемія, окислювальний стрес, захворювання судин та ін. [18, 182, 183].

Доведено ефективність використання лактобацил і біфідобактерій при шкірних захворюваннях [184]. В 2010 році Arck з колегами [185] запропонували концепцію «вісь кишка-мозок», яка передбачає, що модуляція мікробіома шляхом використання пробіотиків може давати глибокі позитивні ефекти, наприклад, на запалення і гомеостаз шкіри. Підвищучи проліферацію Т- і В-лімфоцитів та синтез ІgА, вони відновлюють місцевий імунітет і мікробний пейзаж, нормалізують і підтримують імунну функцію кишечника, що сприяє усуненню запальних симптомів акне і збільшує тривалість ремісії дерматозу [186]. Низкою клінічних досліджень запропоновано у складі комплексного лікування пробіотиками атопічної екземи, атопічного дерматиту, акне, псоріазу, загоєння опіків і шрамів, а також покращення вродженого імунітету шкіри [187, 188].

Таким чином, що глибше вивчаються молекулярні механізми, тим більше схожості спостерігається між пробіотичними і патогенними бактеріями. Пробіотичні штами роду *Lactobacillus spp.* нагадують патогени в багатьох аспектах, таких, як життєздатність і адаптація. Можна уявити собі, що для ефективної конкуренції з патогенами лактобацили повинні використовувати однакові поживні речовини і адгезійні сайти на клітинах. Крім того, наявні дані показують, що пробіотичні лактобацили взаємодіють з різними рецепторами

імунних клітин і модулюють функції епітеліальних. Деякі з цих взаємодій аналогічні для патогенів і відсутні для резидентної і коменсальної мікробіоти. Для деяких патогенних бактерій є характерним ухилення від дії чинників імунної системи і зниження регуляції запальних реакцій [59].

Поява полірезистентних патогенів є серйозною загрозою для громадської охорони здоров'я [189]. Більше того, стійкість до антибіотиків також виникає через присутність неактивних бактерій і персистерів, які виявляють надзвичайну толерантність до антибіотиків, що виникають в результаті уповільнення росту і неактивності основних функцій клітин, контрольованих безліччю бактеріально-регульованих механізмів [190]. Інноваційні стратегії відкриття нових протимікробних агентів включають використання механізму продукування епітеліальними клітинами антимікробних пептидів (AMP), а також дефенсинів і кателицидинів, та молекул бактеріоцинів та небактеріоцинів, що генеруються грамнегативними і грампозитивним бактеріями нормальної мікробіоти [191, 192].

Bush та співав. було підкреслено значення пробіотиків для попередження розвитку і поширення стійкості до антибіотиків у бактерій: «Використання пробіотиків, ймовірно, стане більш важливим в наступні роки, оскільки мікробіологічні дослідження ролі бактеріальних популяцій шлунково-кишкового тракту (людського мікробіома) призводять до ідентифікації цих бактеріальних родів і видів, які відіграють ключову роль як в стані здоров'я, так і хвороби людини» [193]. Такі досягнення цілком можуть привести до використання бактерій і їхніх продуктів, зокрема бактеріоцинів, як конкретних терапевтичних засобів [6, 193].

Нерідко антимікробна активність здійснюється сполуками, які стають дуже нестабільними після їх екстракції з культурального середовища. Ймовірно, сполуки з антимікробною активністю діють синергічно з молочною кислотою, яка сприяє підвищенню проникності бактеріальної мембрани до антимікробних сполук [59, 194]. Пошкодження бактеріальної мембрани деякими штамами роду *Lactobacillus* кишкової мікробіоти людини і декількома кишковими



епітеліальними АМР, спричиняє бактерицидні ефекти, котрі нагадують пошкодження бактеріальних клітин, викликане антибіотиками і бактеріоцинами [6, 42, 193].

Експериментально доведено, що види роду *Lactobacillus*, виділені з мікробіоти піхви людини, набули антиінфекційні властивості проти бактеріологічних патогенів, асоційованих з вагінозом, включаючи *Prevotella bivia* і *G. vaginalis* [98]. На основі експериментальних і клінічних доказів продукування штамми людської мікробіоти специфічних біологічно активних молекул, припустили, що ці бактеріальні молекули можна в сукупності назвати «фармабіотиками» [195].

В майбутньому очікують появу доступних «інструментів» для визначення мікробіоти, що призведуть до визнання мікробіоти з одного боку діагностичним біомаркером хвороби, з іншого – маркером її прогнозування. Натомість антибіотики можуть використовуватись для видалення або пригнічення небажаних представників мікробіома людини, а пробіотики або трансплантація фекальної мікробіоти (ТФМ) застосовуватись для введення або сприяння збільшенню мікроорганізмів з відомими корисними функціями для людського організму [196]. А спільне використання антибіотиків і ТФМ, пребіотиків і пробіотиків або навіть усіх чотирьох методів лікування може забезпечити ефективне лікування багатьох запальних захворювань протягом одного дня [180].

### **1.5. Причини недостатньої ефективності пробіотичних препаратів**

Враховуючи широке використання пробіотиків, необхідне глибоке розуміння їх недоліків і переваг [197].

Лактобацили відносяться до групи мікроорганізмів, що мають найкращі характеристики використання їх пробіотичних видів бактерій. Їх відносять до категорії мікроорганізмів GRAS (generally regarded as safe), тобто класифіковані як «нешкідливі та безпечні для організму людини» і визнані як безпечні для використання людиною. Даний статус надає міжнародне визнання безпеки

пробіотичних штамів і дозволяє необмежене застосування їх у харчовій та фармацевтичній промисловості [198, 199].

Важливим питанням використання пробіотиків є їхня безпека. Так, у США їх застосування не регулюється FDA (Управлінням з контролю з якості харчових продуктів і лікарських засобів), тому що вони класифікуються радше як продукти харчування, ніж як фармацевтичний продукт, що дає можливість купувати їх без рецептів [200]. Хоча пробіотики в основній масі цілком безпечні при тривалому застосуванні, їх слід використовувати з обережністю в певних групах пацієнтів, особливо для новонароджених, недоношених дітей, або імуноскомпрометованих [197].

Існують три теоретичні проблеми, пов'язані з безпекою пробіотиків: 1 - виникнення захворювань, таких як бактеріємія або ендокардит; 2 - токсичні або метаболічні ефекти на ТТ; 3 - перенесення стійкості до антибіотиків шлунково-кишкової флорі [201].

Основними встановленими чинниками ризику є стан імунної системи, порушення функції кишкового бар'єру, пов'язане з поліорганною недостатністю, важким гострим панкреатитом, а також наявність у пацієнта центрального венозного катетеру і серцевих клапанів [202].

Дослідники з Університета Піттсбурга розглянули 814 випадків трансплантації серця і / або легенів, у лікуванні яких застосовували *L. rhamnosus*, і виявили, що у восьми випадках подальші інфекції були викликані лактобацилами. Згодом цей центр припинив використання пробіотиків у пацієнтів після трансплантації грудних органів [203]. Повідомлялося про виникнення бактеріємії, пов'язаних з лактобацилами [204], декілька випадків явного сепсису спричиненого *Lactobacillus* GG [205], а також розвиток абсцесу, пов'язаного з *L. rhamnosus* [206].

Був також випадок лактобацилярної бактеріємії у пацієнта з ВІЛ-інфекцією і хворобою Ходжкіна [204] і випадок зараження лактобацилами після трансплантації кісткового мозку [207].

Основною проблемою, що викликає занепокоєння, є можливість перенесення антибіотикорезистентності між пробіотиками та патогенними бактеріями в шлунково-кишковому тракті [208]. Можливість перенесення резистентності до антибіотиків молочнокислими бактеріями пов'язана із присутністю плазмід з генами, що кодують стійкість до тетрацикліну, еритроміцину, хлорамфеніколу і макролід-лінкозамід-стрептограміну В. Ці R-плазміді були виявлені у *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* і *L. plantarum* в сирому м'ясі, силосі і фекаліях тварин [209, 210]. Спроби молекулярної ідентифікації генів стійкості до ванкоміцину (*vanA*, *vanB*, *vanC*) не підтвердили їхньої наявності у п'яти штамів *L. reuteri* і одного штаму *L. rhamnosis* [211]. Стійкість до ванкоміцину, яка була виявлена, є хромосомною [212].

За використання пробіотиків у реципієнтів з трансплантацією органів та іншими імунодефіцитами було показано відсутність розвитку системної інфекції [213]. Зокрема, було зазначено, що збільшене споживання *Lactobacillus* GG із їжею не викликало збільшення частоти лактобацилярної бактеріємії серед усіх випадків бактеріємії, що було доведено експериментально як *in vitro*, так і *in vivo* (на тваринних моделях), а також у ряді досліджень впливу на людський організм [214]. Не було описано випадків бактеріємії, пов'язаних з ентеральним призначенням пробіотиків новонародженим і дітям раннього віку, хоча теоретичний ризик їхнього виникнення є [200].

Щоб контролювати безпеку пробіотиків у міру їхнього впровадження і широкого використання у всьому світі, важливо провести нагляд за ізольованими пробіотичними бактеріями від пацієнтів з інфекцією. Пробіотики безпечні для використання у здорових людей, але їх слід використовувати з обережністю для осіб з групи ризику [201].

Нові розробки пробіотичних препаратів перед впровадженням повинні бути ретельно оцінені на предмет безпеки, хоча різні штами можуть мати дуже специфічні ефекти. Більш того, наслідки їхнього використання можуть відрізнятися в залежності від стану здоров'я та хвороб, тяжкості протікання хвороби і різних вікових груп. Таким чином, результати клінічних випробувань одного

пробіотичного штаму в одній популяції не можуть бути автоматично екстрапольовані на інші штами або на різні популяції [197]. Безпека і ефективність використання пробіотика повинні оцінюватися окремо для кожного штаму або їх комбінації [215].

Таким чином, у багатьох питаннях мікробіоценозів та біотерапії, які останніми десятиліттями зайняли належне місце у практичній медицині, вченими не досягнуто єдиної думки щодо можливих ризиків застосування препаратів, які містять живі мікроорганізми, а також в аспектах, що стосуються взаємодії імплантованих пробіотичних мікроорганізмів з представниками автохтонної мікробіоти.

Оскільки, за результатами низки досліджень [185, 187, 188] доведено позитивний вплив пробіотиків на мікробіом шкіри, який задіяний до підтримки її гомеостазу, було доцільним детальне вивчення модулюючого впливу на стафілококовий компонент мікробіома шкіри препаратів лактобацил.

Дослідження вказаних питань сприятиме розробці заходів з підвищення ефективності біокорегуючої терапії захворювань різної локалізації.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Об'єм проведених досліджень

Дослідження виконані на базі лабораторії кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Для мікробіологічного дослідження використовували матеріал від пацієнтів, що надходив у лабораторію «Мікробінформ», матеріал пацієнтів, які обстежувались у ЦНДЛ промислової токсикології (мікробіологічний сектор) Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та Клінічної лікарні Львівської залізниці, та матеріал від студентів ЛНМУ імені Данила Галицького. Пацієнти були ознайомлені із метою та методиками дослідження, дали добровільну згоду на участь в обстеженні.

Обстежено 378 осіб, з них 309 - практично здорових, від яких було забрано матеріал з ротоглотки, кишечника, піхви для дослідження мікробіоти і виділення бактерій роду *Lactobacillus spp.* (табл. 2.1). Решта обстежених становили 69 осіб, хворих на *acne vulgaris*, у яких забирався вміст з гнійних пустул.

Моделювання експериментального антибіотикоасоційованого дисбіозу проводили на білих безпородних мишах-самцях (n=27).

Для досягнення поставленої мети проводились такі дослідження: забір матеріалу від хворих; виділення та ідентифікація бактерій з використанням стандартних тест-систем; визначення чутливості мікроорганізмів до протимікробних препаратів; визначення адгезивних властивостей та антагоністичної активності лактобацил; експериментальне створення антибіотико-асоційованого дисбіозу у лабораторних тварин; моделювання біоплівки лактобацил в моно- та змішаній культурі з використанням фазово-контрастної, флуоресцентної та електронної мікроскопії; виявлення генів біоплівкоутворення за допомогою ПЛР; методи математично-варіаційної статистики.

## Обсяг проведених досліджень

Таблиця 2.1

Об'єкт	Характеристика об'єктів дослідження	Кількість
Клінічний матеріал від практично здорових осіб	а) мазки-змиви з ротоглотки	53 осіб
	б) випорожнення	96 осіб
	в) вагінальний секрет	160 осіб
Ізоляти бактеріальних культур <i>Lactobacillus spp.</i>	а) мазки-змиви з ротоглотки	43 штами
	б) випорожнення	60 штамів
	в) вагінальний секрет	72 штами
Ізоляти грибів <i>Candida spp.</i>	вагінальний секрет	10 штамів
Клінічний матеріал зі шкіри пацієнтів хворих на <i>acne vulgaris</i>	гній	69 осіб
Ізоляти <i>Staphylococcus spp.</i>	гній	36 штамів
Референтні штами	<i>L. plantarum</i> P17630, <i>L. plantarum</i> 8R-A3, <i>L. acidophilus</i> KS 400, <i>L. reuteri</i> DSM 179385, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(F-49), <i>S. aureus</i> ATCC 12228, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>K. pneumoniae</i> C, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (F-51)	9 штамів
Лабораторні тварини	Миші-самці	27 особин
Ізоляти бактеріальних культур <i>Lactobacillus spp.</i> з кишечника мишей	фекалії	37 штамів

### 2.2. Мікробіологічні методи дослідження

Дослідження виконані у відповідності до наказу МОЗ України № 500 від 28.12.2002 р. «Про затвердження примірних положень в бактеріологічній службі МОЗ України» та ДСП–9.9.5–2001 МОЗ України «Правила влаштування і безпеки в лабораторіях мікробіологічного профілю» [216].

Мікробіологічні дослідження проводили відповідно до чинних нормативно-методичних матеріалів та методичних рекомендацій [216, 217].

### 2.2.1. Виділення та ідентифікація лактобацил

Для дослідження відбирались практично здорові особи, які на момент забору клінічного матеріалу не приймали антибіотиків (не менше, як впродовж останніх 10 днів), пробіотичних препаратів та впродовж трьох днів не вживали кисломолочних і природно сквашених продуктів. Матеріалом для мікробіологічних досліджень були: слиз з ділянки піднебінних мигдаликів, вагінальний секрет із заднього склепіння вагіни, які забирали стерильним ватним тампоном і вносили в пробірку з 5 мл напіврідкого тіогліколевого середовища. Перед посівом вказане середовища регенерували на водяній бані протягом 20 хв. Посіви інкубували впродовж 48 годин за температури 37 °С. Для виділення чистої культури лактобацил з кишечника 1 г фекалій (не пізніше 2 год з моменту відбору) розводили у 9 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, ретельно струшували, відстоювали, відбирали надосадову рідину і готували розведення ( $10^{-2}$  -  $10^{-9}$ ). Розведення  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  висівали у тіогліколеве середовище і культивували в термостаті впродовж 48 годин за температури 37 °С.

Для отримання ізольованих колоній 0,5 мл культури з тіогліколевого середовища пересівали на чашку Петрі з щільним середовищем MRS (Man, Rogosa, Sharpe), HiMedia, India) та витримували за згаданих вище умов. Мікроекологічний статус відповідної екосистеми визначали за видовим спектром бактеріальних симбіонтів та кількісними показниками: кишечник -  $10^{7-10}$  КУО/г, вагіна -  $10^{8-9}$  КУО/мл, ротоглотка -  $10^{4-7}$  КУО/мл.

Характерні за морфологією колонії були відібрані для додаткового дослідження морфотинкторіальних властивостей та каталазної активності. Біохімічну ідентифікацію лактобацил проводили за допомогою тест-системи API-20 A (bioMérieux SA, Франція) згідно з інструкцією виробника.

### 2.2.2. Визначення антагоністичної активності лактобацил

Антагоністичні властивості вивчали за допомогою методу відтермінованого антагонізму за Фредеріком. Для цього 48-годинну культуру лактобацил засівали у вигляді горизонтальної смужки на щільне середовище

АГВ (середовище, на якому добре культивуються лактобацили, інші бактерії і гриби). Культивування проводили в мікроаерофільних умовах за температури 37 °С, через 48 год знімали культуру лактобацил і на нижню кришку чашки вносили 5 мл хлороформу на 30 хв. Вбиті в парах хлороформу бактерії поміщували в термостат для повного випаровування хлороформу. Після цього добові тест-культури (*S.aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*) наносили перпендикулярними штрихами впритул до смуги лактобацил. Облік результатів проводили через 24-48 год після культивування в термостаті за температури 37 °С, вимірюючи розмір зони затримки росту тест-мікроорганізмів біля смуги лактобацил. Низький ступінь антагонізму, якщо зона затримки була менше 10 мм, середня від 10-20 мм та від 21 мм і більше – висока. Контролем слугували чашки засіяні тест-культурами перпендикулярними штрихами без лактобацил.

### **2.2.3. Визначення адгезивних властивостей лактобацил**

Здатність виділених бактерій до адгезії вивчали на клітинах букального епітелію людини та еритроцитах 0 (1) групи крові за методами [218, 219].

Лактобацили вирощували на середовищі MRS за температури 37 °С впродовж 24 год та центрифугували 5 хв при 3000 об/хв у буфері. Біомасу ресуспендували у фосфатному буферному розчині (ФБР) рН 7,2-7,3 та доводили щільність суспензії до 3 одиниць за МакФарландом, використовуючи стандарт мутності. Букальний епітелій відбирали стерильним шпателем зі слизової оболонки щоки студентів чоловічої статі. Після цього промивали центрифугуванням у ФСБ, підраховували кількість клітин у камері Горяєва і готували суспензію епітеліальних клітин, що містила  $10^8$  кл/мл. Змішували суспензії мікроорганізмів та клітин епітелію у співвідношенні 1:1 та інкубували за температури 37 °С впродовж 30 хв. Після інкубації клітини промивали двічі ФСБ по 5 хв при 200 об/хв для звільнення від неприкріплених бактерій. З осаду клітин готували мазки, забарвлювали за Папенгеймом, та підраховували під мікроскопом (Мікмед-5, збільшення×1000) кількість адгезованих до



епітеліальних клітин лактобацил. Для кожного штаму лактобацил проводили підрахунок на 50 епітеліальних клітинах. Визначали середній показник адгезії (СПА), коефіцієнт участі епітеліальних клітин та еритроцитів (К) та індекс адгезивності мікроорганізму (ІАМ).

СПА – середня кількість бактерій, що прикріпились до однієї епітеліальної клітини. Коефіцієнт (К) участі епітеліальних клітин в адгезивному процесі – відсоток клітин, що мають на своїй поверхні адгезовані бактерії. ІАМ – середню кількість бактерій на одній епітеліальній клітині, що беруть участь у процесі адгезії, – визначали за формулою  $ІАМ = (СПА \times 100) / К$ . Адгезивність вважалась нульовою при  $СПА = 0-1,0$ ; низькою – при  $СПА = 1,01-2,0$ ; середньою – при  $2,01-4,0$  та високою – вище  $4,0$ . Мікроорганізм вважався неадгезивним при  $ІАМ \leq 1,75$ ; низькоадгезивним – при показниках  $1,76-2,5$ ; середньо-адгезивним –  $2,51-4,0$  та високоадгезивним при  $ІАМ > 4,0$ .

Здатність лактобацил до адгезії вивчали з використанням нативних еритроцитів людини I (0) групи крові згідно зі стандартними методиками [218]. Формалінізовані еритроцити двічі відмивали 0,1 М розчином фосфату натрію центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 15 хв. На ФСБ готували завісину еритроцитів щільністю  $10^8$  кл/мл, на ізотонічному розчині завісину бактерій. Суміш із еритроцитів (0,5 мл) та лактобацил (0,5 мл) інкубували впродовж 30 хв за температури  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , періодично зтрушуючи. Приготовані мазки на предметному склі висушували за кімнатної температури, забарвлювали за методом Паппенгейма. Мікроскопували за допомогою світлового мікроскопа і визначали СПА, ІАМ, К.

#### **2.2.4. Дослідження чутливості лактобацил до протимікробних препаратів**

Медикаментозну чутливість лактобацил визначали диско-дифузійним методом [216]. Для цього використовували добову культуру, з якої готували завісину у тіогліколовому середовищі  $10^6$  КУО. Приготований інокулюм рівномірно розподілили на чашках з щільним середовищем MRS. Диски

антибіотиків наносили на поверхню середовища і визначали чутливість до хіміотерапевтичних антимікробних препаратів різних класів (Аспект, Київ; HiMedia, India) на середовищі MRS. Тестування проводилися згідно з вимогами виробника, облік результатів проводили, вимірюючи лінійкою діаметр зони затримки росту мікроорганізмів. Інтерпретацію результатів здійснювали за наступною схемою: зона інгібування 7-11 мм – слабочутливі, 12-20 мм – помірночутливі та 21-35 мм – високочутливі. Відсутність зони пригнічення росту свідчила про стійкість цього штаму до препарату [216, 220].

### **2.3. Визначення складу мікробіоти кишечника мишей за умов антибіотикоасоційованого дисбіозу**

Для експерименту відібрано білих безпородних мишей-самців (n=27) масою 18-22 г, яких утримували в стандартних умовах [221] у відповідності до правил Європейської конвенції по захисту хребетних тварин. Для створення експериментального дисбактеріозу усім мишам вводили доочеревинно антибіотики широкого спектру дії - лінкоміцин та ципрофлоксацин послідовно з допомогою двох ін'єкцій - з розрахунку по 0,4 мг кожного антибіотика на 1 кг ваги тварин впродовж трьох днів. Після цього тварин поділили на чотири групи, яким до основного харчового раціону додавали: першій групі мишей (контроль, n=6) стерильний фізіологічний розчин; другій групі (n=7) – індигенні штами лактобацил; третій (n=7) – завесь штамів лактобацил пробіотиків; четвертій (n=7) – суміш штамів індигенних та пробіотичних лактобацил.

Для дослідження мікробіоценозу кишечника мишей відбирали 1 г випорожнень, розводили методом десятикратних розведень у стерильному фізіологічному розчині і розсівали на щільні диференційно-діагностичні і селективні середовища для виділення ентеробактерій, стафілококів, ентерококів та грибів роду *Candida*. Для виділення лактобацил використовували стандартне середовище MRS-агар, а біфідобактерій - середовище Блаурока. Ідентифікацію лактобацил проводили за морфотинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями з використанням тестів API-20 (Hi Media, Індія).

Підраховували кількість мікроорганізмів (КУО) кожного виду окремо. Отримані результати перераховували в десяткові логарифми залежно від кількості мікробних клітин.

Для відновлення мікробіоти мишам згодовували разом з кормом щоденного раціону суспензію лактобацил у кількості 1 мл густиною  $10^7$  КУО/мл десять днів поспіль. Для цього культуру *L. plantarum* 8R-A3 з пробіотичного препарату «Лактобактерин» (Біофарма, Київ) отримували шляхом культивування в мікроаерофільних умовах спочатку у тіогліколевому середовищі, а потім на MRS-агарі.

Забір фекалій для оцінки мікробіоти проводили до і після введення антибіотиків, після 10-денної біокорекції та через 13 днів (період відновлення).

Впродовж усього експерименту проводили контрольне вимірювання маси тіла тварин.

#### **2.4. Методи дослідження біоплівкоутворення *in vitro* у лактобацил та стафілококів**

Первинно відбір мікроорганізмів, що могли належати до плівкоутворюючих форм, здійснювали за характерними культуральними властивостями, а саме за підвищеною в'язкістю біомаси колонії. Після цього плівкоутворюючу чисту культуру стафілококів засівали на живильний агар та інкубували в термостаті упродовж 24 год за температури 37 °С. Біоплівки на дні пластикових чашок (Ø 50 мм) формували так: у кожену чашку вносили по 4 мл живильного бульйону («Фармактив», Україна) та по 10 мкл культури мутністю  $1,5 \times 10^9$  кл/мл (що відповідає 5 од. за стандартом McFarland) так, щоб суспензія рівномірно розподілилася на дні чашки. Для визначення контрольного показника у чашки вносили стандартну культуру *S. aureus* ATCC 25923, що утворює біоплівку, та пробіотичний штам *L. plantarum* 8R-A3 «Лактобактерин», який було виділено з комерційного препарату на стандартному середовищі для лактобацил у MRS-агарі.

Аналогічно формували біоплівки лактобацил на MRS-бульйоні. Для цього у пластикові чашки вносили по 4 мл вказаного середовища та по 5 мкл інокуляту стафілококів і лактобацил густиною  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл. Чашки інкубували в термостаті 48 год за температури 37 °С. Через 48 год вміст чашок відбирали, таким чином, щоб не зруйнувати сформовану біоплівку, та відмивали тричі дистильованою водою. Для фіксації біоплівки вносили 400 мкл 1%-ного спиртового розчину генціанвіолету й витримували за кімнатної температури упродовж 45 хв. Після цього розчин відбирали і тричі промивали чашки дистильованою водою, підсушували, вносили етиловий спирт і інкубували за кімнатної температури упродовж 45 хв. Оптичну щільність плівки вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (довжина хвилі 545 нм). Згідно з технічним описом та інструкцією з експлуатації приладу, межі допустимої абсолютної похибки у вимірюванні коефіцієнта пропускання в спектральному діапазоні від 400-750 нм, що відповідає максимуму поглинання для генціанвіолету, становить  $\pm 0,5$  %. Визначення оптичної густини проводили згідно з методикою [222]. Необхідності у калібруванні приладу не виникало, оскільки не було потреби визначати абсолютну концентрацію барвника в розчині або кількість клітин. На основі значення оптичної густини можна проводити якісну оцінку щільності плівки. Щільність сформованих біоплівок вважали низькою, якщо показник становив менше 0,5 од., середньою - від 0,5 до 1,0 од. і високою за оптичної густини розчину більше 1,0 од. Усі дослідження повторювали тричі.

#### **2.4.1. Дослідження життєздатності бактерій у структурі біоплівки**

Для визначення кількості життєздатних клітин як стафілококів, так і лактобацил, у змішаних культурах із біоплівок (бікультури) проводили посіви 10 мкл на щільне середовище відразу після інокуляції та через 12, 24, 48 год. У разі значної густини одержаної культури перед посівом її розводили, що давало змогу встановити кількість пророслих колоній.

У процесі вивчення життєздатності бактерій у біоплівках використовували подвійне прижиттєве фарбування за допомогою

флуоресцентних барвників, а саме Hoechst-33258, який вільно проникає крізь клітинні мембрани, зв'язується з ДНК на зовнішньому боці спіралі, зумовлюючи при цьому флуоресценцію в зеленій ділянці спектра [223]. Пропідіум йодид (PI) проникає лише у мертві клітини та зв'язується з ДНК, зумовлюючи флуоресценцію в червоній ділянці спектра [224, 225]. Для виявлення життєздатних бактерій плівки вирощували на стерильних покривних скельцях. Мікроскопію бактеріальних біоплівок проводили за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse (об'єктив 63x/1.4NA) методом інтерференційної (диференційно-інтерференційний контраст - DIC) мікроскопії з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії.

#### **2.4.2. Дослідження ультраструктурної будови бактерій у складі біоплівки**

Підготовку зразків для трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) проводили з використанням класичних методик [ 226, 227].

Приготування зразків моно- та змішаних культур лактобацил та стафілококів для електронно-мікроскопічного дослідження проводили, як описано в пункті 2.4. Сформовані плівки центрифугували (10 хв. 3000-4000 об.), і промивали дистильованою водою тричі від залишків середовища. Після цього фіксували в 1,5% розчині чотирьохокису осмію в 0,2 М какодилатному буфері (рН – 7,2) на холоді впродовж 2 год. Зафіксовані культури промивали 3 рази в буфері, а потім центрифугували протягом 10 хв. Отримані осадки культур зневоднювали в зростаючих концентраціях етилового спирту (25%, 50%, 70%, 90% і 96%), кожен раз по 10 хв. Потім матеріал витримували в ацетоні 2 рази по 30 хв. Епоксидні смоли (Fluka) змішували у співвідношенні Epon 812 – 4,5 мл, DDSA – 2,2 мл, MNA – 2,2 мл. Матеріал просочували в чотирьох сумішах епоксидної смоли і ацетону у співвідношеннях 1:3, 1:2, 1:1 і 2:1. Останнє просочування проводили 14 год, після чого матеріал переносили в поліпропіленову капсулу у свіжу суміш епоксидних смол з каталізатором (5 крапель DMP-30 на 10 мл смол) і полімеризували в термостаті послідовно за

температури 37 °С (12 год), а потім – 60 °С (48 год). З одержаного блоку готували зрізи на ультрамікротомі LKB Ultratome III за допомогою скляного ножа, переносячи їх на нікелеві сіточки. Зрізи контрастувались послідовно в 2 % спиртовому розчині уранілацетату і цитраті свинцю.

Переглядали в електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ–100-01 при напрузі 75 кВ при збільшеннях від  $\times 1000$  до  $\times 30000$ .

## 2.5. Визначення генів біоплівкоутворення, *icaA* та *icaD*, у стафілококів за допомогою ПЛР

Присутність генів біоплівкоутворення, *icaA* та *icaD*, визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Досліджували 28 штамів *S. aureus*, які виділено з гнійних пустул хворих *acne vulgaris*.

Хромосомну ДНК із ізолятів *S. aureus* екстрагували згідно інструкції до наборів Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Reserch, США).

Праймери, що використовуються для виявлення ПЛР генів, які кодують утворення біоплівки, були раніше опубліковані [228]: *ica A F* (5'-ССТ ААС ТАА СГА ААГ GTAG-3') & *ica A R* (5'-ААГАТАТАГСГАТААГТГС-3') амплікон розміром 1315 bp, *ica DF* (5'-АААСГТААГАГАГГТГГ-3') & *ica DR* (5'-GGCAАТАТГАТСААГАТАС-3') амплікон розміром 381 bp.

Амплікацію проводили в термоциклері «Mastercycler nexus» (Eppendorf AG 22331, Німеччина). Реакційна суміш містила 5 мкл Dream Tag Green Buffer, 1 мкл dNTP 10M, 0,5 мкл прямого і зворотного праймерів, 2,5 мкл ДМСО, 37 мкл бідистильованої води, 0,5 мкл полімерази Dream Tag і 3 мкл ДНК стафілокока.

Програма ПЛР: початкова денатурація при 94 °С, 4 хв, а потім 30 циклів 94 °С - 40 сек., 48 °С - 30 сек. і 72 °С 1 хв., і кінцевий етап розширення при 72 °С, 10 хв. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі з фарбуванням бромід етидієм (0,2 мкг / мл).

Фотографування гелів проводили за допомогою апаратно-програмного комплексу Gene Genius (Syngene, Німеччина).

## **2.6. Дослідження бактеріоцидної активності лактобацил за допомогою методу дифузії в агар**

Антибактеріальну активність досліджуваних штамів лактобацил щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* вивчали за допомогою методу дифузії в агар, використовуючи нативні бактеріальні культури лактобацил (НБК), їхні відфільтровані надосадові рідини лактобацил (ВНР) та нейтралізований супернатант (НС).

Молочнокислі бактерії культивували в MRS бульйоні за температури 37 °С в анаеробних умовах впродовж 12, 24, 48 год для встановлення стадії найвищої антагоністичної активності. 10 мкл культури ( $10^9$  КУО/мл) індикаторних штамів стафілококів, вирощених в бульйоні Мюллера-Хінтона впродовж 24 год за температури 37 °С, вносили у чашки з агаром Мюллера-Хінтона (HiMedia, India) і втирали шпателем. У перфоровані лунки діаметром 5 мм на чашку вносили по 10 мкл 12-, 24-, 48-годинних НБК лактобацил, ВНР 12-годинних культур лактобацил, які отримували центрифугуванням 15 хв при 4000 об/хв та відфільтровуванням через мембранні фільтри ( $d=0,45$  мкм). Для отримання НС (12 год) та виявлення серед досліджуваних штамів лактобацил - продуцентів бактеріоцинів, відфільтровані надосадові рідини нейтралізували 2 н NaOH до рН 7, додатково обробляли каталазою (Sigma, 1 мг/мл) для знешкодження дії пероксиду водню та інкубували за 37 °С впродовж 1 години. Усі оброблені супернатанти зберігали за температури 4 °С. Розраховували антагоністичну активність вимірюванням зон пригнічення росту, при цьому від отриманих результатів віднімали діаметр лунки. Зони пригнічення: висока активність - 10-16 мм; середня 9-4 мм; низька < 4 мм [229].

## **2.7. Статистична обробка результатів дослідження**

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне

значення ( $M$ ), стандартну похибку ( $m$ ). Достовірність змін встановлювали за  $t$ -критерієм Стюдента.



### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### **Характеристика індигенних лактобацил травного, уrogenітального трактів і ротоглотки та лактобацил – складників пробіотичних препаратів**

Кожен з природних біотопів людського організму є саморегулюючою системою та тісно пов'язаний з іншими біоценозами та макроорганізмом в цілому. Важливою об'єднуючою ланкою між найбільшими екосистемами (травний, уrogenітальний тракти та ротоглотка) виступають представники резидентної мікробіоти - бактерії роду *Lactobacillus*. Їхня нестача або повна відсутність може призвести не тільки до мікроекологічних порушень, але й до розвитку патологічних та імунодефіцитних станів. Тому нашим завданням було вивчення видового спектру, їх мікроекологічних характеристик лактобацил різних екологічних ніш.

#### **3.1. Частота висівання та видовий спектр лактобацил травного, уrogenітального трактів та ротоглотки практично здорових осіб**

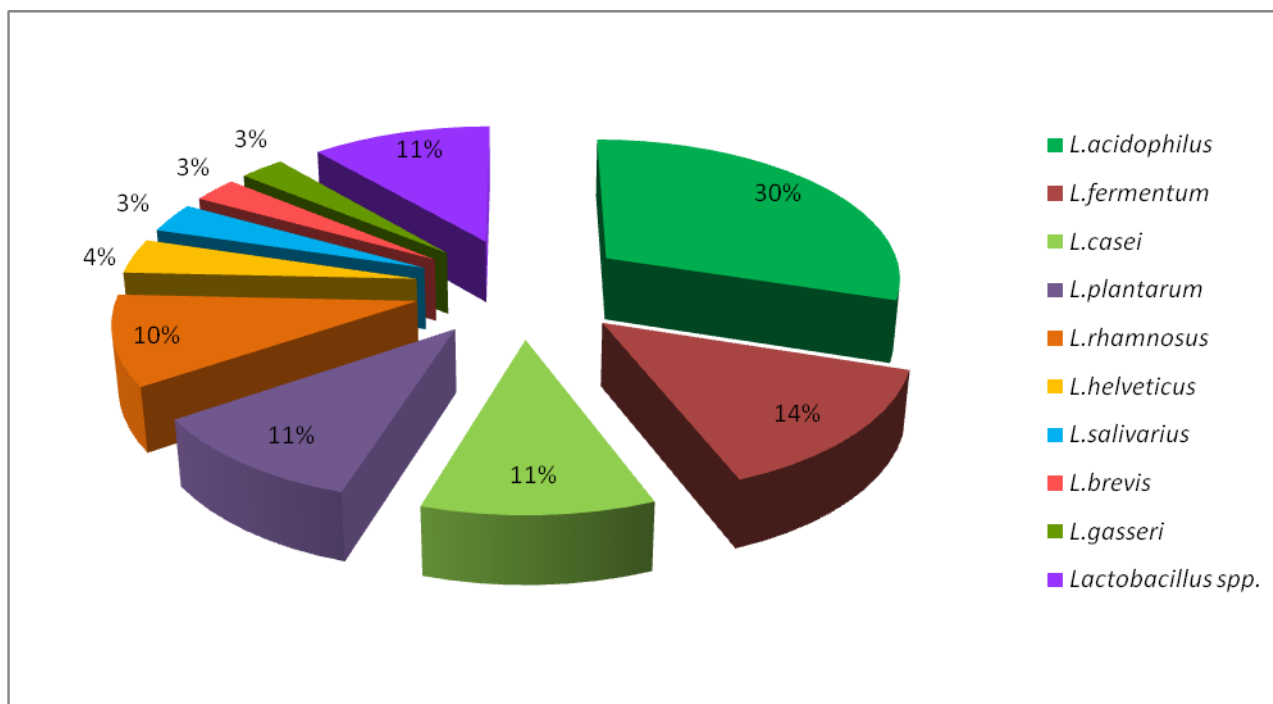
З метою виділення лактобацил проведено обстеження практично здорових осіб. Відібрано змиви з ротоглотки у 53 осіб, випорожнення у 96 пацієнтів. При проведенні профілактичного гінекологічного огляду було обстежено 160 жінок віком від 18 до 52 років, в яких на момент огляду скарг не було. Мазки і змиви з поверхні слизових вагіни відбирались на 5-6 день менструального циклу.

Клінічний матеріал пацієнтів надходив у лабораторію «Мікробінформ» на базі кафедри мікробіології і мікробіологічного сектору центральної науково-дослідної лабораторії ЛНМУ імені Данила Галицького; матеріал гінекологічних пацієнтів - з Клінічної лікарні Львівської залізниці. Пацієнти були ознайомлені із метою та методиками дослідження, дали добровільну згоду на участь в обстеженні.

В ході проведеного дослідження виділено та ідентифіковано 175 штамів лактобацил травного, уrogenітального трактів та ротоглотки. За видовим складом на *L. acidophilus* припадало 53 штами, *L. fermentum* - 26, *L. casei* – 20,

*L. plantarum* – 20, *L. rhamnosus* – 19, *L. helveticus*-5, *L. salivarius* – 6, *L. brevis*– 5, *L. gasseri* - 3 (рис. 3.1) [230-236].

При порівнянні частоти висівання лактобацил з різних біотопів встановлено, що найбільший відсоток ізолятів (від загальної кількості штамів, виділених з біотопу) отримано з ротоглотки - 43 (81,1 %), 60 (62,5 %) - з травного тракту і найменше виділено з уrogenітального тракту - 72 (45 %).



**Рис. 3.1. Видовий спектр індигенних лактобацил, виділених від практично здорових людей**

Домінування *L. acidophilus* виявлено у всіх екологічних нішах і становило 30,3 %, проте у вагінальному секреті практично однаково високі рівні показали *L. acidophilus* (16,7 %) та *L. fermentum* (15,3 %).

Штами *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* виявлялись у різних кількостях в усіх біотопах. Однак *L. brevis* висіяно з ротоглотки та випорожнень, а *L. helveticus*, *L. gasseri* - лише з вагінального секрету, *L. salivarius* з ротоглотки і вагіни. Найбільша частка серед лактобацил, виділених з фекалій, 38,3 % припадала на *L. acidophilus*, 16,7 % - *L. fermentum*, по 11,7 % - на *L. casei* та *L. plantarum*, решту штамів висівали у менших відсотках. Серед ізолятів із

ротоглотки високі показники встановлено для *L. acidophilus* – 41,8 %, *L. rhamnosus* (14,0 %), *L. casei* та *L. fermentum* (11,6 %), інші штами були представлені в меншій кількості (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

### Видовий спектр лактобацил, виділених з різних біотопів людини

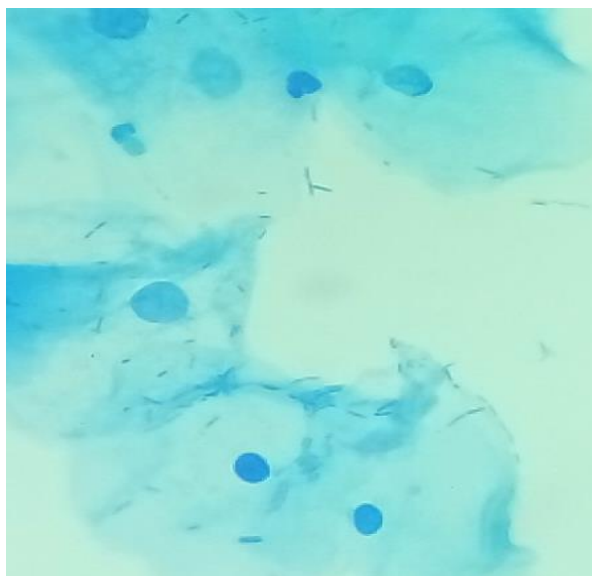
Вид лактобацил	Кількість штамів, виділених з:			
	Ротоглотки, (n=53)	Випорожнень, (n=96 )	Вагіни, (n=160 )	Абс.к-ть штамів
<i>L. acidophilus</i> *	18 (41,8%)	23 (38,3%)	12 (16,7%)	53
<i>L. fermentum</i> ○	5 (11,6%)	10 (16,7%)	11 (15,3%)	26
<i>L. casei</i> ○	5 (11,6%)	7 (11,7%)	8(11,1%)	20
<i>L. plantarum</i> ○	3 (7%)	7 (11,7%)	10 (13,9%)	20
<i>L. rhamnosus</i> ○	6 (14%)	4 (6,7%)	9 (12,5%)	19
<i>L. salivarius</i> *	2 (4,7%)	-	4 (5, 6%)	6
<i>L. helveticus</i> *	-	-	5 (6,9%)	5
<i>L. brevis</i> ○	2 (4,7%)	3 (5%)	-	5
<i>L. gasseri</i> *	-	-	3 (4,2%)	3
Інші види <i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	2 (4,7%)	6 (10%)	10 (13,9%)	18
Всього:	43 (100%)	60 (100%)	72 (100%)	175

Примітка: \* - гомоферментативні лактобацили, ○ - гетероферментативні лактобацили

Високий показник виділення лактобацил з ротоглотки пов'язаний з наявністю гомоферментативних штамів, що становило 46,5 % в порівнянні з кишечником і піхвою, де кількісно переважають гетероферментативні - 51,7 % і 52,8 % відповідно (табл. 3.1).

У зв'язку з низькою частотою виділення лактобацил з вагінального секрету проведено детальніший аналіз мікробіоти піхви [230, 231].

При мікроскопічному дослідженні мазків вагінального вмісту жінок, що не мали скарг, спостерігали клітини плоского епітелію в середньому від 5 до 12 в полі зору, «спокійні» лейкоцити, тобто без ознак морфологічних змін і фагоцитозу від 0 до 18 в полі зору, невелику кількість слизу (рис. 3.2).



**Рис. 3.2. Мікроскопічна картина нормобіоти вагіни ( $\times 1000$ ).**

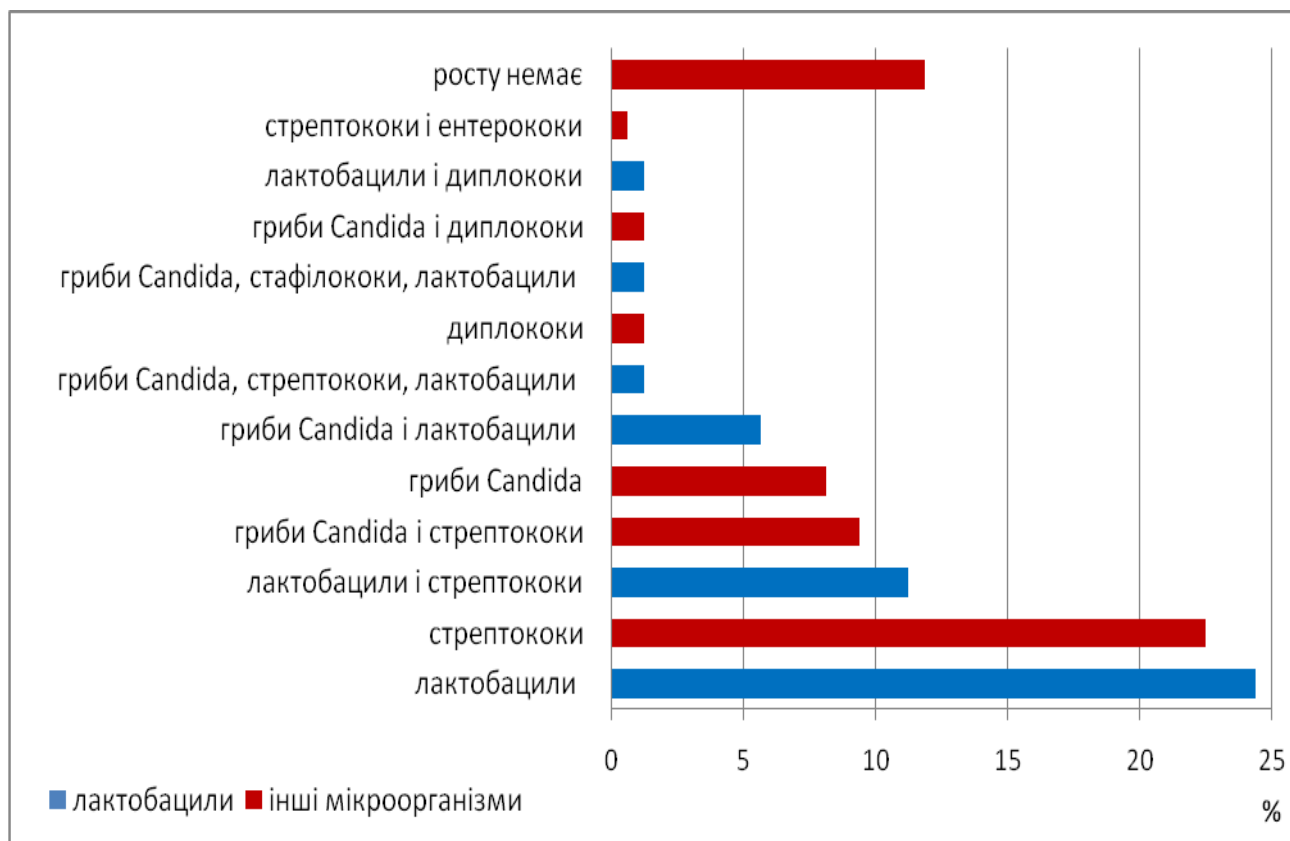
#### **Забарвлення метиленовим синім**

Бактеріальна мікробіота в основному представлена лактобацилами - товстими, великими, прямими або дещо зігнутими бацилами різної величини з «обрубаними» кінцями, які іноді розташовуються ланцюжками. У невеликих кількостях виявлялись умовно-патогенні бактерії (*Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Mobiluncus spp.*).

У результаті проведеного мікробіологічного дослідження з посівів виділяли в окремих жінок лише культури лактобацил, а також монокультури грибів роду *Candida*, коків та їхні асоціації.

Під час наших досліджень лише у 24,38 % жінок у піхві виділено лактобацили, що засвідчило стан еубіозу. В інших обстежених пацієнтів лактобацили

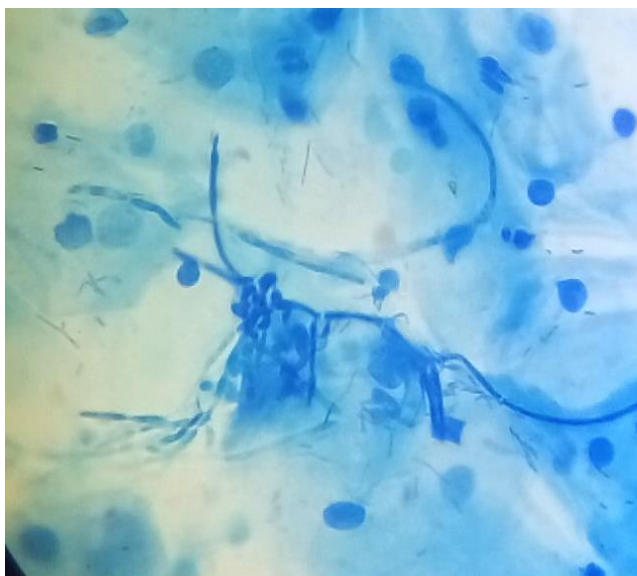
зустрічались в асоціації з можливими представниками нормобіоти, що складає 20,63 %. Коки, які виявлялись на тлі відсутності лактобацил, становили 24,38%, у змішаній флорі - 26,25 %. Ізольовані коки віднесено до родів *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* У 55 % практично здорових жінок з вагінального секрету не виділено лактобацил, що свідчить про поширеність мікробіологічних порушень серед осіб репродуктивного віку (рис. 3.3).



**Рис. 3.3. Мікробіота піхви практично здорових жінок**

Гриби роду *Candida* виявлено у 26,87 %, з них у поєднанні з лактобацилами виділялися у 30,23 % обстежених (рис. 3.4).

Такий високий показник висівання грибів у практично здорових жінок свідчить про безсимптомне носійство *Candida*, яке при задіюванні найменшого чинника призводить до розвитку запального процесу.



**Рис. 3.4. Псевдоміцелій грибів *Candida* у вагінальному вмісті здорових жінок (×1000). Забарвлення метиленовим синім**

Така розмаїтість мікробіоти вагіни, за відсутності клінічних проявів запального процесу, може бути пов'язана з компенсованим дисбіозом вагіни, змінами у гормональному фоні, інфікуванням при частій зміні партнерів, застосуванням гормональної контрацепції, хронічними урогенітальними інфекціями на тлі послаблення імунітету, що призводить до їхнього безсимптомного перебігу.

Оскільки кожний з біотопів є системою стабільною і саморегулюючою, відтак найменший дефіцит лактобацил призводить до мікроекологічних зрушень не тільки у ньому, а й в організмі в цілому. Наступним етапом дослідженням було вивчення біологічних властивостей лактобацил.

### **3.2. Біологічні властивості індигенних штамів лактобацил в порівнянні з властивостями пробіотичних штамів**

Бактерії роду *Lactobacillus spp.* відносять до родини *Lactobacillaceae* і включають більше 100 видів [239]. Окрім чималої розповсюженості лактобацили у різноманітних харчових продуктах, рослинах, стічних водах, вони

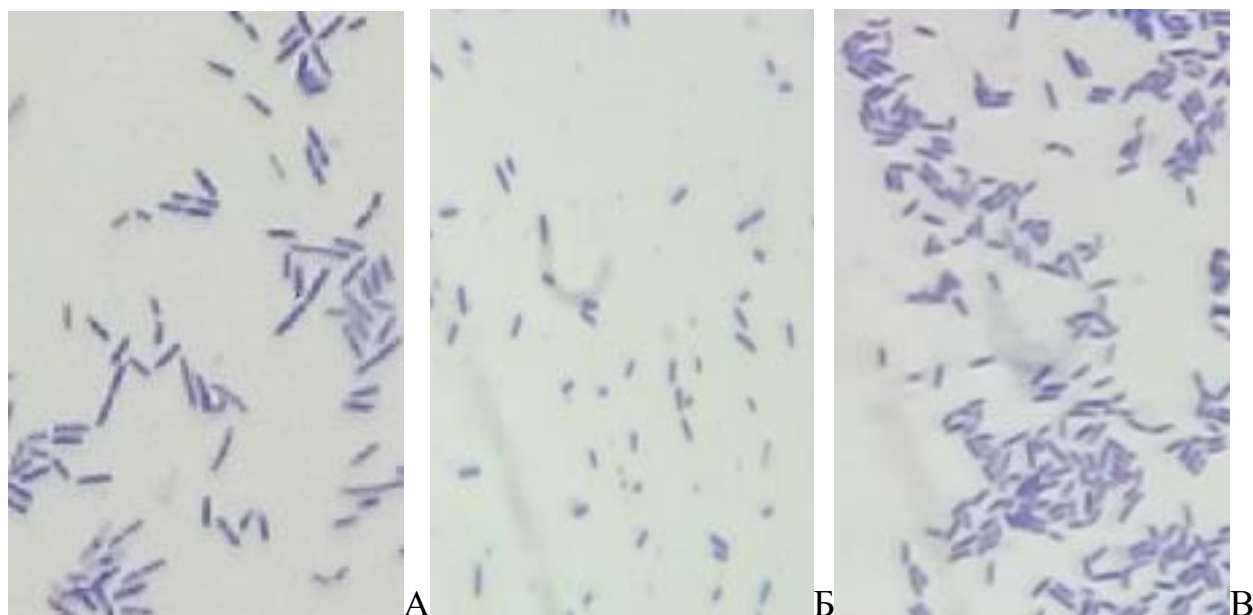
є постійними представниками нормальних біоценозів як людського організму, так і багатьох теплокровних тварин.

### **3.2.1. Морфотинкторіальні, культуральні та ферментативні властивості**

Усі виділені лактобацили – нерухомі, грампозитивні палички, які не утворюють спор, різної величини, розташовуються у вигляді окремих клітин, коротких ланцюжків та можуть утворювати ниткоподібні форми. У деяких штамів при фарбуванні метиленовим синім спостерігається зернистість цитоплазми (рис. 3.5). При видовій ідентифікації лактобацил враховували морфологічні та культуральні властивості, аеротолерантність, здатність лактобацил ферментувати деякі вуглеводи, рости при температурі 30 °С та 44 °С, відсутність каталазної активності та резистентність до жовчі.

За характером анаеробної ферментації вуглеводів лактобацили поділяють на облігатні гомоферментативні, факультативно гетероферментативні та облігатні гетероферментативні. Гомоферментативні лактобацили зброджують вуглеводи з утворенням більше як 85 % лактату, гетероферментативні, дисимілюють глюкозу пентозофосфатним шляхом з утворенням лактату, оцтової кислоти, етанолу, двоокису вуглецю.

Для культивування лактобацил використовували стандартні середовища MRS та його модифікації. У середовище MRS входять пептон, м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт, твін-80, глюкоза, цистин, ацетат натрію, цитрат амонію, сульфат магнію, сульфат марганцю, натрію гідрофосфат, агар-агар, дистильована вода. Джерелом органічного азоту є пептон, м'ясний екстракт, в якості джерела вітамінів групи В – дріжджовий екстракт, джерела вуглецю – глюкоза. Активний ріст лактобацил забезпечують цистин, вітаміни групи В, твін-80 та солі амонію, магнію, марганцю. Однак на цьому середовищі важко нарощувати біомасу лактобацил. Також недоліком середовища є висока вартість імпортного продукту, що обмежує можливість його придбання практичними лабораторіями.



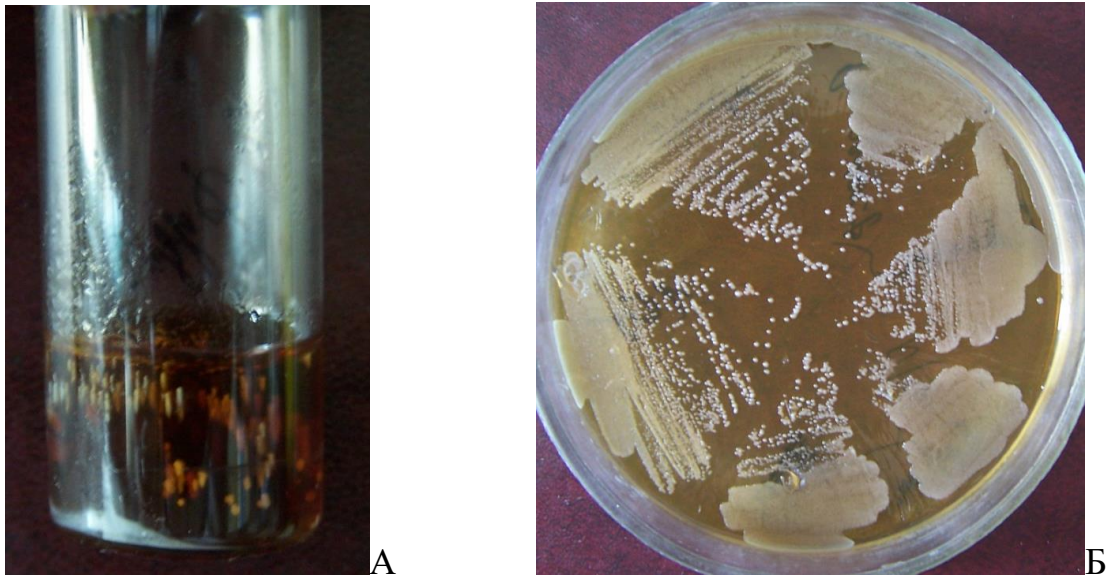
**Рис. 3.5. Мікрофотографія чистих культур лактобацил (×630). Забарвлення за методом Грама: А - *L. acidophilus*; Б - *L. brevis*; В - *L. fermentum***

Так як лактобацили дуже є вибагливими до поживних середовищ, виникали труднощі у їхньому виділенні з клінічного матеріалу, нами вперше запропоновано спосіб культивування бактерій роду *Lactobacillus* на щільному поживному середовищі на основі ячмінного солоду (10%) з додаванням лактози і натрію хлориду [237, 238].

Для цього спочатку клінічний матеріал засівали у напіврідке тіогліколеве середовище (рис. 3.6, А), а після цього використовували середовища на основі ячмінного солоду. На цьому середовищі ми отримували колонії лактобацил величиною 2-5 мм непрозорі, гладкі або шорсткі (R- або S-типу), білого або кремового кольору (рис. 3.6, Б). У напіврідкому тіогліколевому середовищі спостерігався ріст лактобацил у вигляді вертикальних тяжів.

Для визначення видової приналежності лактобацил використовували біохімічні тест-системи API-20 А (bioMérieux SA, Франція) (рис. 3.7). При роботі із стріпами та бактеріальними культурами керувались інструкцією. Оцінку та інтерпретацію результатів проводили через 24 – 48 год.





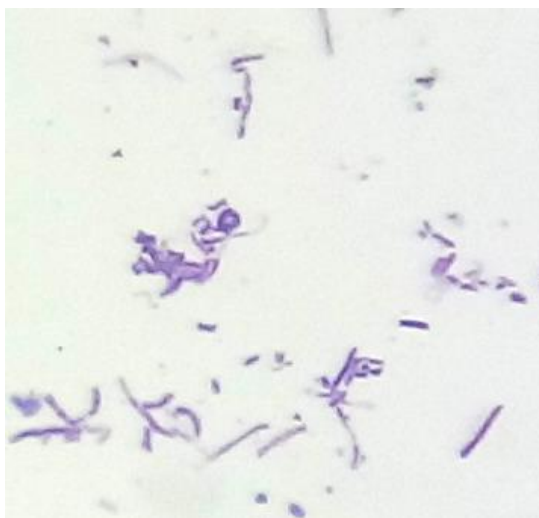
**Рис. 3.6. Ріст чистих культур лактобацил: А - у тiogліколевому середовищі; Б - на середовищі на основі ячмінного солоду**



**Рис. 3.7. Ідентифікація *L. plantarum* за допомогою біохімічної тест-системи API-20**

За результатами ідентифікації ізолятів лактобацил їхня біохімічна активність в основному відповідала характеристиці видів відповідно до визначника Берджі [240].

Проте, зафіксовано дисоціацію штаму *L. rhamnosus* за культуральними (поява колоній R-форми) та морфологічними властивостями (поява зігнутих, скручених клітин) (рис. 3.8) у пацієнта з частими дисбіотичними розладами.



**Рис. 3.8. Мікрофотографія чистої культури *L. rhamnosus* (×630).  
Забарвлення я за методом Грама**

Біохімічна активність цього штаму теж дещо вирізнялась від решти штамів *L. rhamnosus*. Зафіксовано утилізацію арабінози та не зброджування мелецитози (табл. 3.2), на відміну від інших штамів *L. rhamnosus* (S-форма), які ферментували мелецитозу та не зброджували арабінозу.

Таблиця 3.2

**Ферментативні властивості дисоціантів штаму *L. rhamnosus***

Вид лактобацил	глюкоза	маніт	лактоза	сахароза	мальтоза	саліцин	ксилоза	арабіноза	ескулін	целобіоза	маноза	мелецитоза	рафіноза	сорбіт	рамноза	трегалоза
<i>L. rhamnosus</i> , S-форма	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i> , R- форма	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Оскільки *L. rhamnosus* є факультативно-гетероферментативні лактобацили, тому можуть зброджувати вуглеводи двома шляхами – гліколітичним та пентозофосфатним. Дисоціант *L. rhamnosus* (R-форма)

втратив здатність утилізувати олігосахариди (мелецитоза), проте набув властивість ферментувати арабінозу.

### **3.2.2. Антагоністична активність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил**

Нормоценоз жіночої сечостатевої системи – це стан мікробіоценозу, що характеризується абсолютним домінуванням лактобацил та низьким титром умовно-патогенних мікроорганізмів, який має важливе значення для здоров'я жінки [96]. Основне місце (95 %) серед індигенних фізіологічних бактерій піхви займає рід *Lactobacillus spp.*, про це свідчать високі показники чисельності лактобацил у вагінальному секреті здорової жінки до  $10^9$  КУО/см<sup>3</sup> [105].

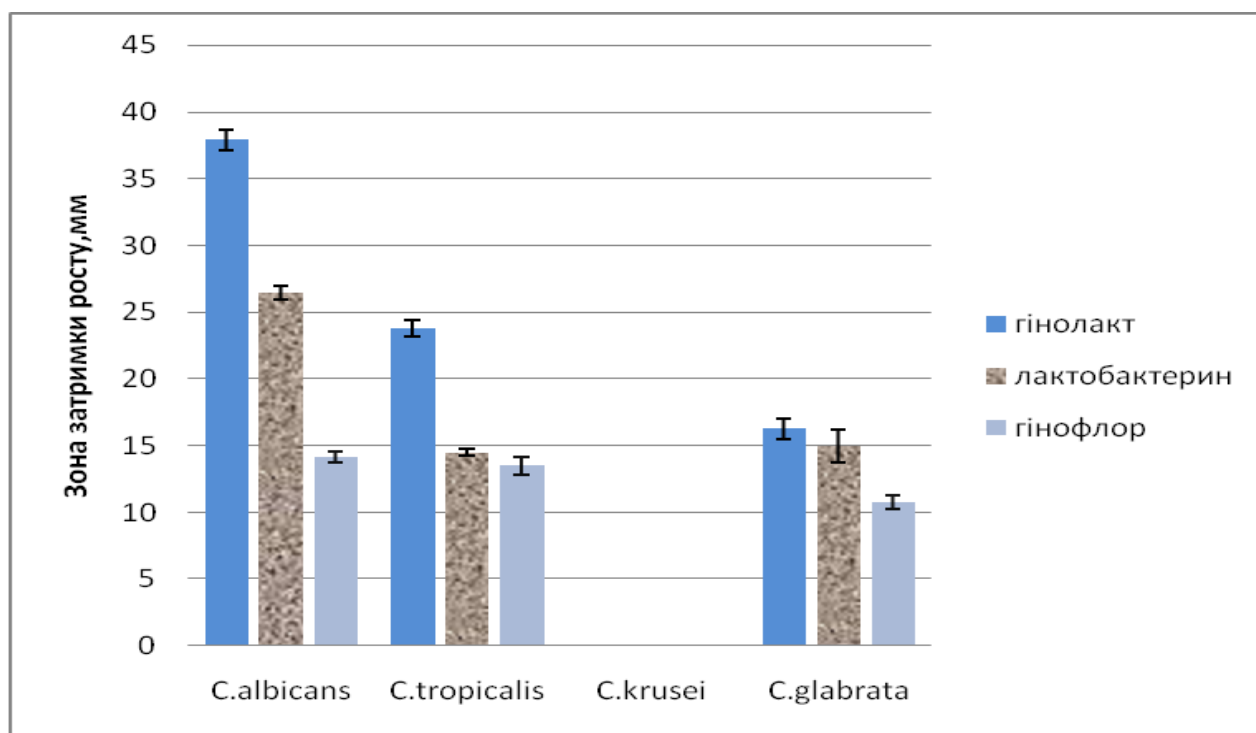
Метою цього дослідження було встановлення протимікробної активності лактобацил відносно грибів роду *Candida* та інших умовно-патогенних бактерій, виділених з вагіни від практично здорових жінок та у жінок з проявами вульвовагінального кандидозу.

#### **3.2.2.1. Антагоністична активність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил відносно грибів роду *Candida***

Для аналізу результатів активності пробіотичних та клінічних штамів лактобацил відносно умовно-патогенних бактерій ми брали до уваги сумарний ефект антагоністичної активності методом відтермінованого антагонізму за Фредеріком. Нами були отримані наступні результати [232].

Пробіотичні препарати, які містять *L. plantarum* P17630 (Гінолакт), в середньому затримують ріст *C. albicans*, виділених від практично-здорових жінок із зоною інгібування  $37,89 \pm 0,76$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 (Лактобактерин) –  $26,43 \pm 0,53$  мм, а *L. acidophilus* KS 400 (Гінофлор) -  $14,11 \pm 0,42$  мм, а від хворих з кандидозним вульвовагінозом - *L. plantarum* P17630  $34,85 \pm 1,09$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 та *L. acidophilus* KS 400 показали майже однакові рівні активності – зона затримки росту склала  $14,29 \pm 0,42$  мм і  $15,21 \pm 0,43$  мм. Зони затримки росту *C. albicans* препаратом, що містить *L. acidophilus* KS 400, як у практично здорових,

так і у жінок з вульвовагінальним кандидозом були практично на одному рівні (рис. 3.9, 3.10, 3.11, 3.12).



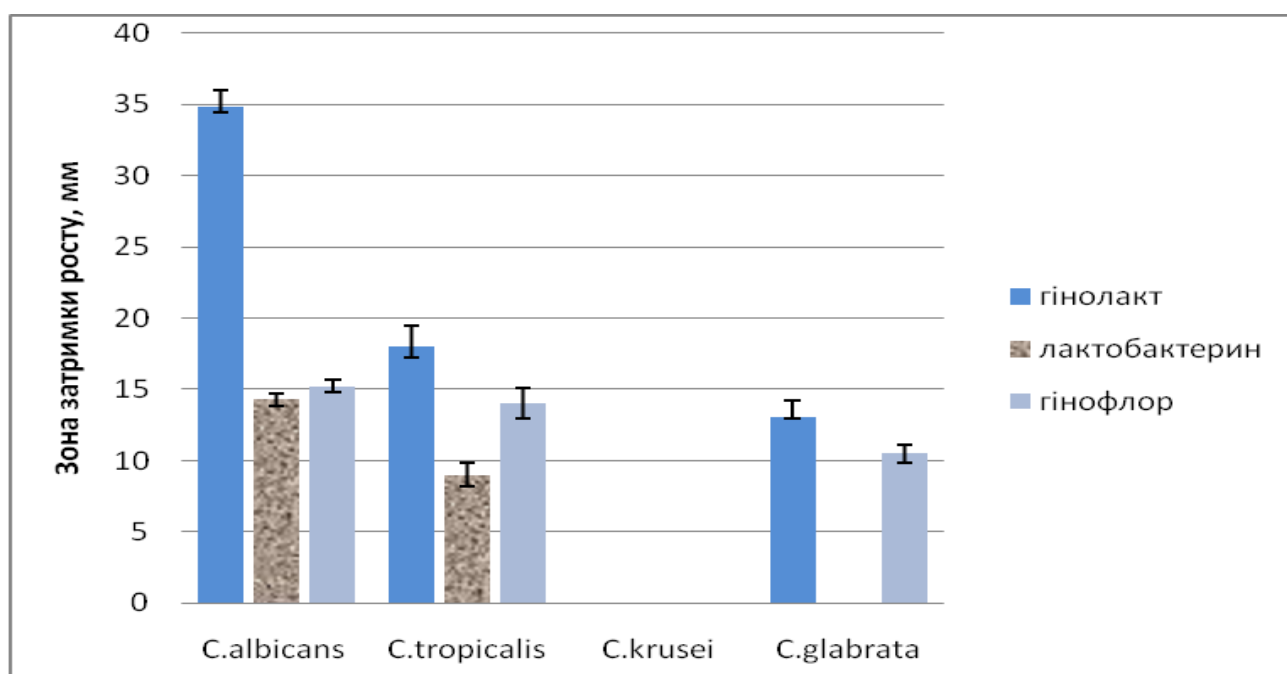
**Рис. 3.9. Антагонізм пробіотичних штамів *Lactobacillus spp.* щодо грибів роду *Candida*, виділених з піхви практично здорових жінок**

Щодо антагоністичних властивостей лактобацил відносно видів *C. non-albicans* спостерігається значне зниження зон інгібування росту грибів. Пробиотичні штами затримували ріст *C. tropicalis* у практично здорових жінок: *L. plantarum* P17630 – на  $23,77 \pm 0,63$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 – на  $14,5 \pm 0,29$  мм та *L. acidophilus* KS 400 – на  $13,5 \pm 0,65$  мм (рис. 3.9). Зона затримки росту *C. tropicalis*, виділених від жінок з вульвовагінальним кандидозом, під дією *L. plantarum* P17630 становила  $18,0 \pm 1,47$  мм, *L. acidophilus* KS 400 –  $14,0 \pm 1,08$ , *L. plantarum* 8R-A3 –  $9,0 \pm 0,81$  мм (рис. 3.10).

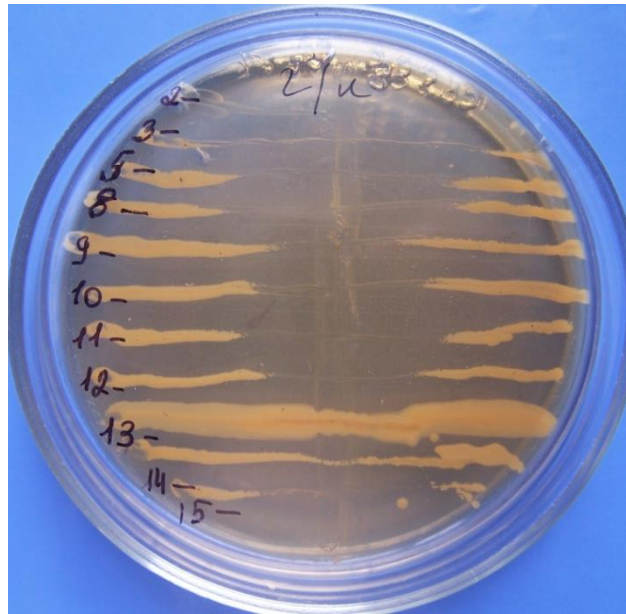
У випадку зі штамми *C. krusei*, які виділені від практично здорових жінок та з вульвовагінальним кандидозом, ми отримали відсутність зони інгібування пробіотичними штамми.

Пробіотичні препарати, які містять *L. plantarum* P17630, затримують ріст *C. glabrata*, виділених від практично здорових жінок, із зоною інгібування  $16,25 \pm 0,75$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 –  $15,22 \pm 1,22$  мм, *L. acidophilus* KS 400 –  $10,75 \pm 0,49$  мм. Від хворих з кандидозним вульвовагінозом у присутності *L. plantarum* P17630 зона затримки росту складала  $13,0 \pm 1,22$  мм, *L. acidophilus* KS 400 –  $10,5 \pm 0,65$  мм, а *L. plantarum* 8R-A3 не виявив антагоністичної дії відносно *C. glabrata* (рис. 3.9, 3.10).

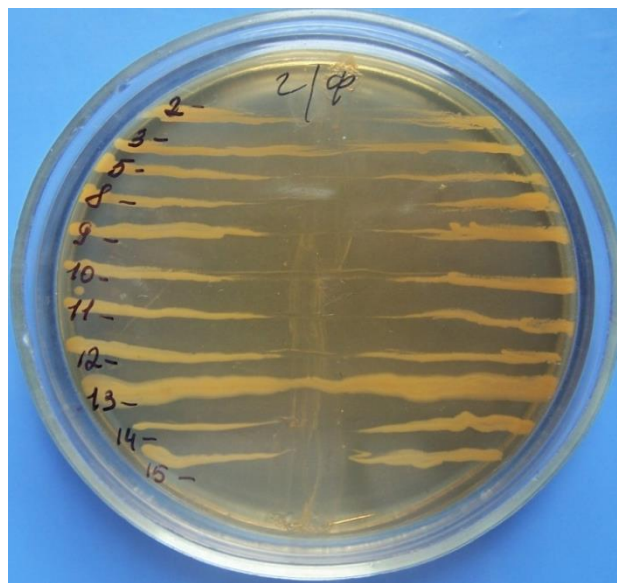
Порівнюючи зони інгібування росту грибів роду *Candida*, виділених з піхви як практично здорових жінок, так і з вульвовагінальним кандидозом, штамом *L. acidophilus* KS 400, ми зафіксували стабільний ефект на одному рівні  $9,59 \pm 3,33$  мм та  $9,93 \pm 3,58$  мм. Слід зазначити, що найбільшу антагоністичну активність відносно грибів роду *Candida*, виявив пробіотичний штам *L. plantarum* P17630, вона склала  $17,97 \pm 3,52$  мм і була значно вищою за активності штамів *L. plantarum* 8R-A3 та *L. acidophilus* KS 400, достовірно відрізнялася ( $p < 0,05$ ), показники яких були практично однаковими –  $9,9 \pm 2,38$  мм і  $9,76 \pm 1,56$ .



**Рис. 3.10.** Антагонізм пробіотичних штамів *Lactobacillus spp.* щодо грибів роду *Candida*, виділених від жінок з вульвовагінальним кандидозом



**Рис. 3.11. Інгібування росту клінічних ізолятів грибів роду *Candida* препаратом «Гінолакт»**



**Рис. 3.12. Інгібування росту клінічних ізолятів грибів роду *Candida* препаратом «Гінофлор»**

Проте, усі досліджувані зразки - пробіотичні штами лактобацил та гриби роду *Candida* - більшою чи меншою мірою виявляли антагоністичну активність та викликали затримку росту. Отримані дані вказують, що ця властивість є штамовою ознакою. З усіх пробіотичних лактобацил *L. plantarum* 8R-A3 проявив

найменшу активність щодо видів *C. non-albicans* у жінок з вульвовагінальним кандидозом.

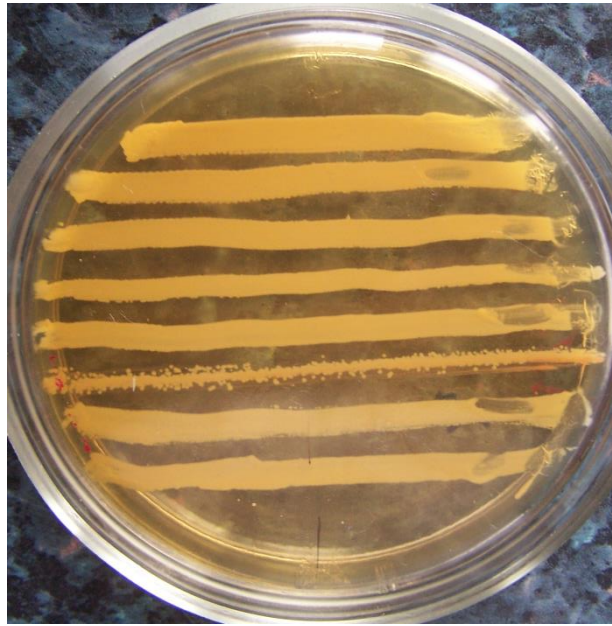
Клінічні ізоляти лактобацил, які виділялись з піхви, ураженої грибами роду *Candida* і були ідентифіковані, як *L. plantarum* та *L. acidophilus*, практично не затримували ріст клінічних ізолятів досліджуваних грибів, лише останній мінімально інгібував *C. albicans* із зонами  $3,21 \pm 0,07$  мм та  $1,71 \pm 0,1$  мм. Результати представлені у таблиці 3.3 та на рисунку 3.13.

Зони затримки росту для *C. albicans*, які виділені від практично здорових осіб, до клінічних ізолятів *L. plantarum* в середньому становили  $12,04 \pm 0,37$  мм, а від хворих з кандидозним вульвовагінітом -  $6,64 \pm 0,5$  мм, до клінічних ізолятів *L. acidophilus* –  $5,61 \pm 0,5$  мм та  $7,29 \pm 0,34$  мм відповідно.

Таблиця 3.3

**Антагоністична активність індигенних ізолятів *Lactobacillus spp.***

Дослід- жувані групи	Види тестованих ізолятів	Практично здорові жінки		Хворі на вульвовагінальний кандидоз	
		Зона затримки росту, мм (M±m)			
		<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>
Практично здорові жінки	<i>C. albicans</i>	$12,04 \pm 0,37$	$5,61 \pm 0,3$	0	$3,21 \pm 0,07$
	<i>C. tropicalis</i>	0	$7,8 \pm 2,7$	0	0
	<i>C. krusei</i>	0	0	0	0
	<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0
Хворі на вульвовагіна льний кандидоз	<i>C. albicans</i>	$6,64 \pm 0,5$	$7,29 \pm 0,34$	0	$1,71 \pm 0,1$
	<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0
	<i>C. krusei</i>	0	0	0	0
	<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0



**Рис. 3.13. Антагонізм клінічних ізолятів лактобацил відносно видів *C. non-albicans***

Отримані результати свідчать про відсутню антагоністичну активність індигенних ізолятів лактобацил відносноштамів *C. non-albicans* та незначну відносно *C. albicans* ( $p < 0,001$ ). Проте ізоляти лактобацил від здорових жінок виявляли вищу активність відносно *C. albicans* в порівнянні з ізолятами від жінок, хворих на вульвовагіноз.

### **3.2.2.2. Антагоністична активність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил щодо умовно-патогенної бактеріальної мікробіоти**

3–5% нормального піхвового біоценозу становлять транзиторні мікроорганізми (окремі види ентеробактерій, стрептококи, коринебактерії, стафілококи, гарднерели, мікоплазми та ін.), які є потенційними патогенами і при зниженні захисної функції піхвового біотопу або зміні чисельності того або іншого мікроорганізма-опортуніста можуть стати етіологічним чинником патологічних процесів [241].

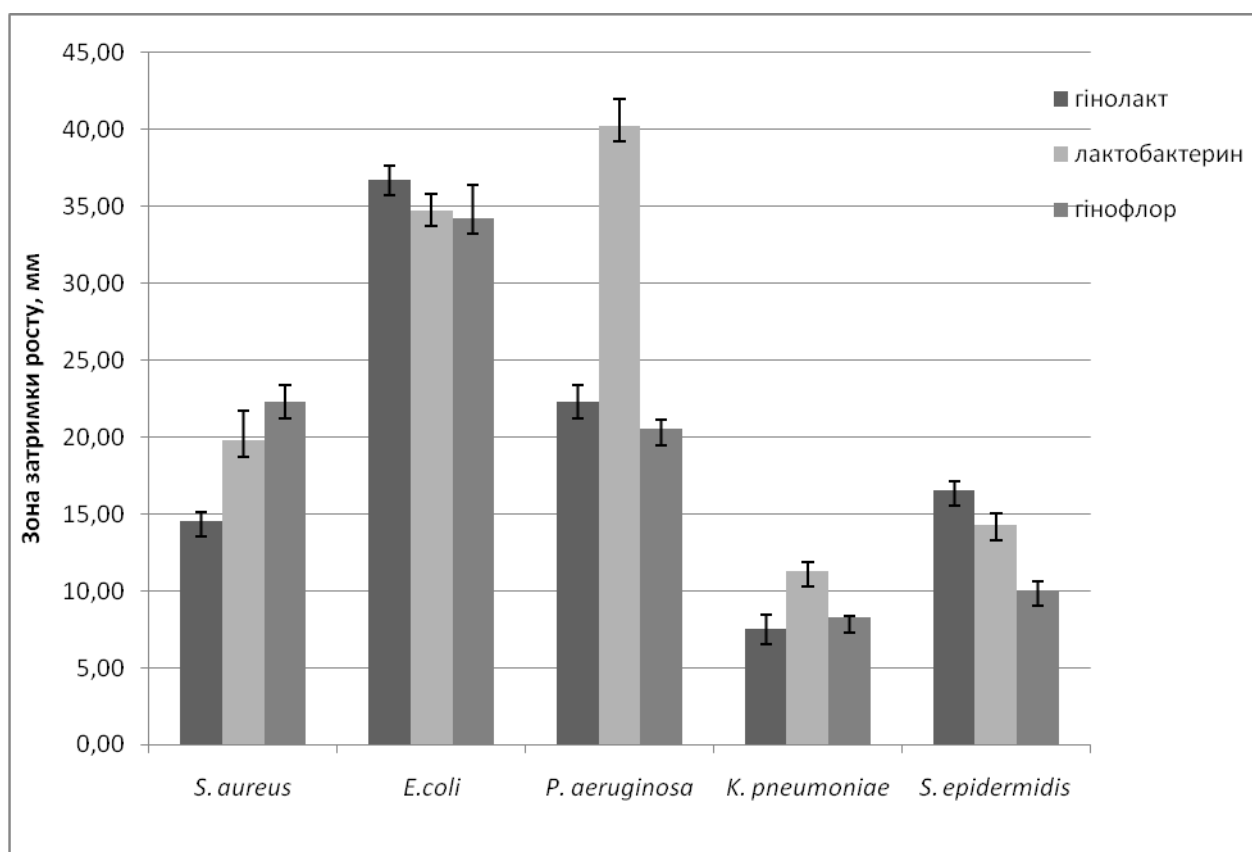
Вище згадане стало підставою для вивчення антагоністичних властивостей лактобацил щодо умовно-патогенних бактерій [232]. Група контролю була представлена музейними штамми *S. aureus* ATCC 25923 (F-49),



*Escherichia coli* ATCC № 25922, *K. pneumoniae* C, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), *S. epidermidis* ATCC 12228.

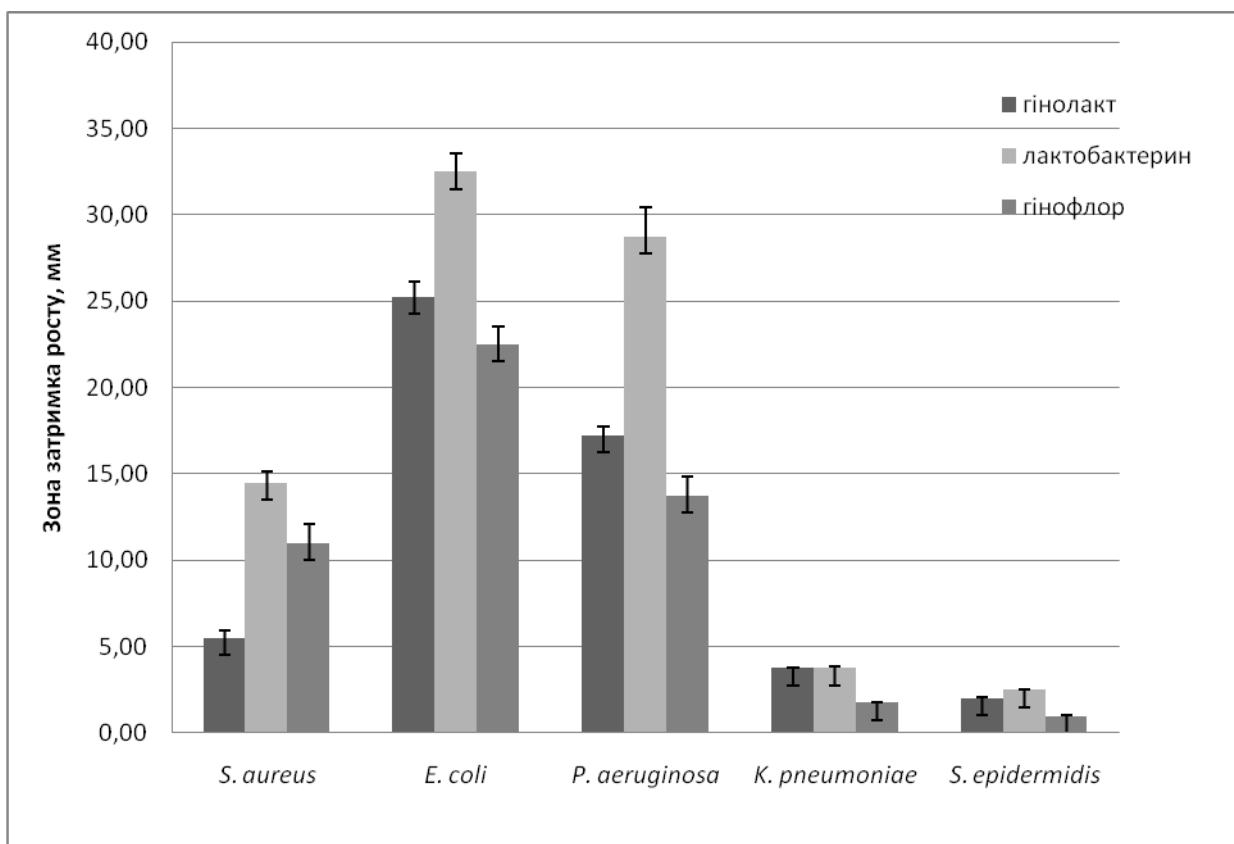
Найвищу антагоністичну активність виявляли штами пробіотичних лактобацил *L. plantarum* P17630 щодо музейних *E. coli* ATCC 25922 зона затримки росту -  $36,75 \pm 0,85$  мм і *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51) -  $22,25 \pm 1,1$  мм, аналогічно *L. acidophilus* KS 400 -  $34,25 \pm 2,17$  мм і  $20,5 \pm 0,65$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 -  $34,75 \pm 1,03$  мм і  $40,25 \pm 1,7$  мм. Усі пробіотичні штами виявили мінімальну активність відносно *K. pneumoniae* C: *L. plantarum* P17630 інгібував ріст до  $7,5 \pm 0,65$  мм, *L. acidophilus* KS 400 - до  $8,25 \pm 0,65$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 – до  $11,25 \pm 0,75$  мм.

Низьку антагоністичну активність відносно *S. epidermidis* ATCC 12228 продемонстрував *L. acidophilus* KS 400, вона складала  $10 \pm 0,08$  мм.



**Рис. 3.14. Антагоністична активність пробіотичних штамів лактобацил відносно умовно-патогенних бактерій (музейні штами)**

Зони затримки росту клінічних ізолятів умовно-патогенних бактерій були дещо менші у порівнянні з активністю музейних: *L. plantarum* P17630 затримував ріст *E. coli* на  $25,25 \pm 0,85$  мм, *P. aeruginosa* на  $17,25 \pm 0,48$  мм, *L. acidophilus* KS 400 -  $22,5 \pm 1,04$  мм,  $13,75 \pm 1,11$  мм, *L. plantarum* 8R-A3 -  $32,5 \pm 1,04$  мм,  $28,75 \pm 1,65$  мм. Клінічні ізоляти *S. epidermidis* ( $1 \pm 0,01$  мм) та *K. pneumoniae* ( $1,75 \pm 0,02$  мм) виявили найменшу чутливість до дії пробіотичного штаму *L. acidophilus* KS 400 (рис. 3.15).

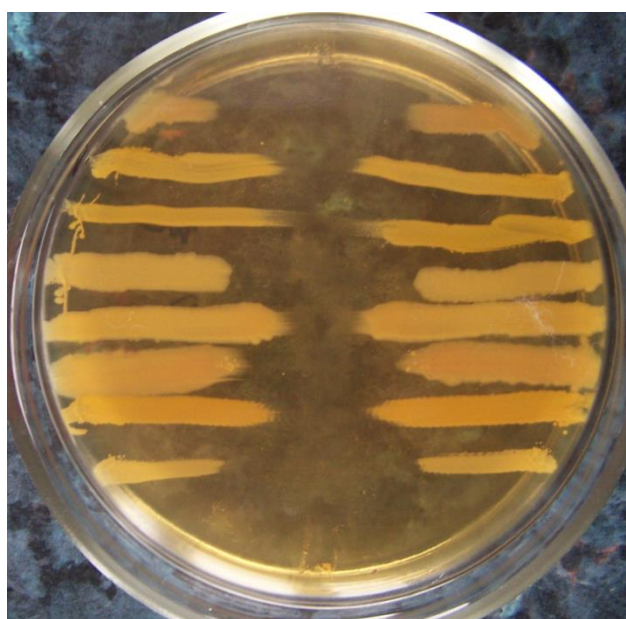


**Рис. 3.15. Антагоністична активність пробіотичних штамів лактобацил відносно умовно-патогенних бактерій (клінічні штами)**

Ряд дослідів ми проводили на середовищі АГВ без додавання глюкози та з її додаванням. Оскільки лактобацили потребують анаеробних умов культивування, додавання в середовище глюкози сприяло зниженню його редокс-потенціалу, що забезпечувало більш інтенсивний ріст бактерій. Окрім того, додавання глюкози, певною мірою давало змогу змоделювати подібні умови *in vitro* до фізіологічних у вагіні.

Усі досліджувані штами лактобацил не затримували ріст грибів роду *Candida* та умовно-патогенних бактерій на середовищі АГВ у той час, як при додаванні до нього глюкози (0,4%), збільшувалась біомаса лактобацил і зона затримки ними росту умовно-патогенних мікроорганізмів (рис. 3.16).

Таким чином, доведено *in vitro*, що для оптимального прояву антагоністичних властивостей бактерій роду *Lactobacillus spp.* потрібно забезпечити оптимальні умови (близькі до умов *in vivo*) для їхнього культивування.



**Рис. 3.16. Антагонізм лактобацил на 0,4% глюкозному АГВ**

На основі результатів затримки росту пробіотичними штамами лактобацил референтних штамів та клінічних ізолятів умовно-патогенної мікробіоти виявлено достовірну перевагу в 1,7 разів ( $p < 0,001$ ) щодо останніх, як сумарно, так і окремо кожного пробіотичного штаму.

Слід відзначити, що лікування антибактеріальними препаратами (перорально і інтравагінально) не усуває дисбіозу урогенітального тракту, що є основною причиною вульвовагінальних захворювань, а призводить до низького рівня одужання та збільшує кількість рецидивів. Отже, використання пробіотичних препаратів у комбінованих схемах є перспективною стратегією для лікування і профілактики.

### 3.2.3. Адгезивність індигенних та пробіотичних штамів лактобацил

Адгезія є одним з найважливіших факторів, за допомогою яких індигенна мікробіота здатна колонізувати біотопи людини. Адгезивність мікроорганізмів до еукаріотичних клітин є початковою ланкою патогенезу при розвитку інфекційних захворювань, що викликають патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми і одним із механізмів захисної дії представників нормальної мікробіоти, яка безпосередньо бере участь у формуванні пристінкових шарів слизових оболонок [242].

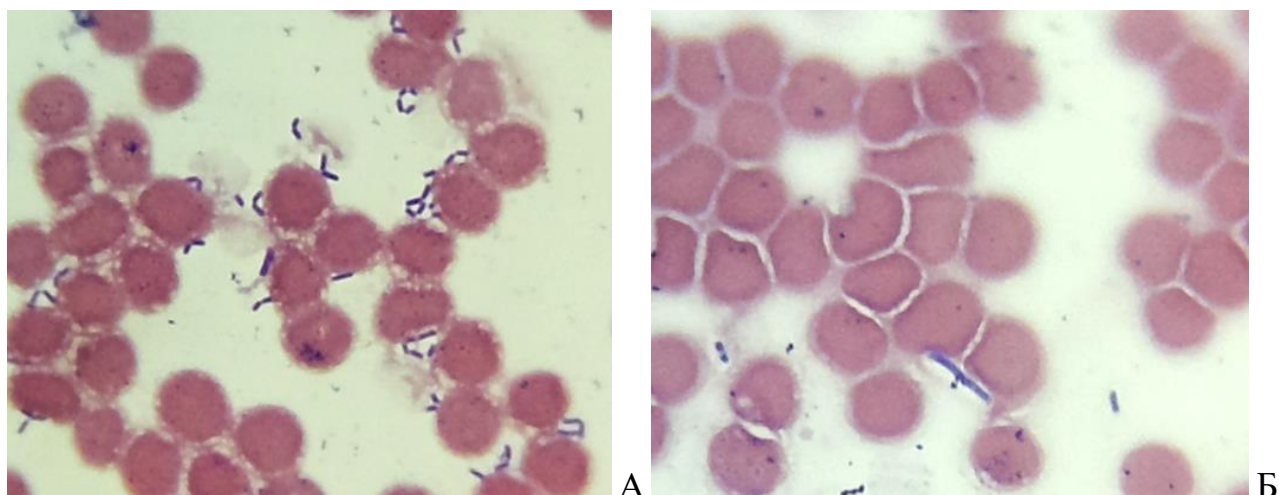
Адгезія нормосимбіонтів, зокрема лактобацил, до епітеліальних клітин зумовлює можливість виживати в умовах біотопів макроорганізму та формувати біоплівку, опосередковуючи таким чином пасивний антагонізм щодо умовно-патогенних бактерій [243].

Метою наших досліджень було порівняння адгезивних властивостей лактобацил, виділених з різних біотопів людського організму та складників пробіотичних препаратів до клітин букального епітелію та еритроцитів 0 (1) групи крові системи АВ0 людини.

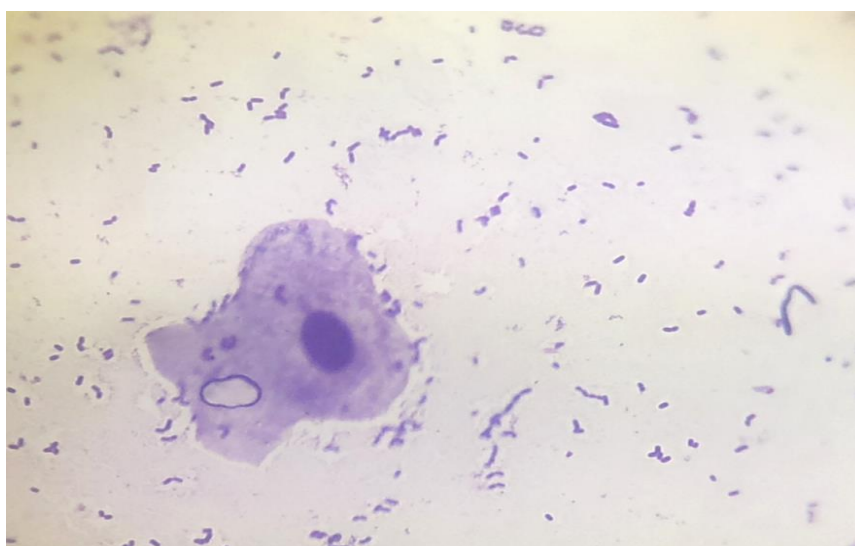
Для дослідження відібрано 102 штами лактобацил, з них 32 «оральних», 41 «кишкових» та 29 «вагінальних» ізолятів. За видовим складом серед ізолятів відповідних біотопів домінували види лактобацил: *L. acidophilus* (з ротової порожнини - 15 штамів, кишечника - 12, вагіни - 9), відповідно *L. plantarum* (4, 6, 3), *L. fermentum* (5, 10, 8), *L. rhamnosus* (4, 3, 6), *L. casei* (4, 7, 3), лише вид *L. brevis* (3) виділявся тільки з кишечника [233- 235].

В процесі досліджень були встановлені відмінності у показниках адгезії лактобацил до букального епітелію (рис. 3.16) та еритроцитів 0 (1) групи крові (рис. 3.17).

Практично усі ізоляти лактобацил виявили високу та середню адгезивну активність щодо букального епітелію. Високоадгезивними виявились усі «вагінальні» ізоляти лактобацил і в середньому індекс адгезивності складав  $4,19 \pm 0,1$ , а середньоадгезивними «оральні» та «кишкові» -  $3,76 \pm 0,02$  та  $3,47 \pm 0,03$  (рис. 3.18) .

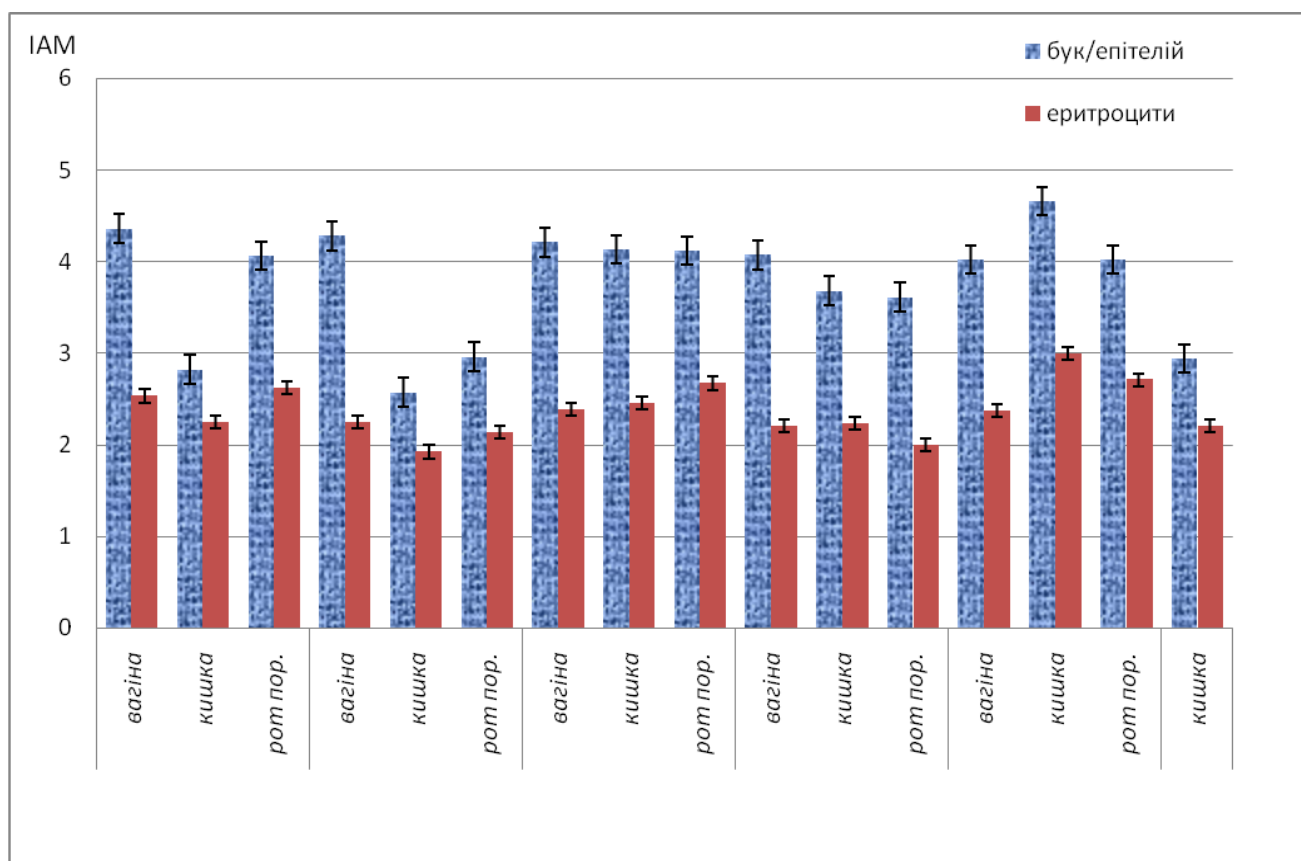


**Рис. 3.16.** Адгезія лактобацил на еритроцитах людини: А – високоадгезивний вагінальний штам *L. plantarum*. Б – низькоадгезивний кишковий штам *L. rhamnosus*. Зabarвлення за Паппенгеймом ( $\times 630$ )



**Рис. 3.17.** Адгезія лактобацил на букальному епітелії.  
Зabarвлення за Паппенгеймом ( $\times 630$ )

Серед «кишкових» ізолятів найбільш виражену адгезію до букального епітелію виявляли *L. casei*  $4,66 \pm 0,04$ , *L. acidophilus*  $4,13 \pm 0,08$ . Найвищу адгезивність встановлено для «оральних» ізолятів *L. acidophilus* та *L. plantarum* ( $4,12 \pm 0,07$  та  $4,10 \pm 0,08$ ). У ізолятів *L. casei*, як з ротової порожнини так і з вагіни, адгезивна активність однакова:  $4,02 \pm 0,02$  та  $4,02 \pm 0,03$  відповідно (рис. 3.18).



**Рис. 3.18. Індекс адгезивності (ІАМ) лактобацил, ізольованих з різних біотопів**

Найвищий коефіцієнт участі в адгезивному процесі епітеліальних клітин - більше 90 % - був у штамів *L. plantarum* та *L. acidophilus*, виділених з ротової порожнини, у *L. acidophilus* та *L. casei*, виділених з кишечника та у вагінальних штамів *L. plantarum* і *L. rhamnosus*. Найнижчий відсоток (78 %) епітеліальних клітин з адгезованими лактобацилами зафіксовано при дослідженні адгезивності кишкового ізолята *L. rhamnosus*.

Слід зазначити, що індекс адгезивності лактобацил до еритроцитів є значно нижчим, ніж до букального епітелію ( $p < 0,001$ ), що, вірогідно, пов'язане з характером поверхні і з більшими розмірами епітеліальних клітин.

Так, ІАМ *L. acidophilus*, що були виділені з різних біотопів, до букального епітелію становив  $4,15 \pm 0,03$ , а до еритроцитів відповідно  $2,5 \pm 0,01$  ( $p < 0,001$ ). Слабі адгезивні властивості до еритроцитів виявили «оральні» ізоляти *L. fermentum* та *L. rhamnosus* –  $2,0 \pm 0,03$  та  $2,14 \pm 0,02$ .

Майже усі штами, виділені з кишечника та вагіни, слабо адгезувались до еритроцитів в проміжку від 2,45 до 1,92, за винятком *L. casei* кишкового походження і *L. plantarum*, ізольованого з вагіни, у яких ІАМ склав  $3,0 \pm 0,03$  і  $2,53 \pm 0,08$ .

При дослідженні здатності пробіотичних штамів лактобацил прикріплюватися до клітин різного походження, встановлено менш виражену різницю в кількісних показниках щодо букального епітелію та еритроцитів. Найбільшу адгезію зафіксовано у *L. reuteri* DSM 179385 -  $5,18 \pm 0,03$ . Результати цих досліджень наведені нижче у таблиці 3.4.

Також потрібно відмітити, що адгезивна активність пробіотичних штамів *in vitro* та *in vivo* може відрізнятись, позаяк в лабораторних умовах пробіотичні штами лактобацил мають більш сприятливі умови для їхньої життєдіяльності.

Таблиця 3.4

#### Показники індексу адгезії пробіотичних штамів лактобацил

Клітини	Пробіотичні штами			Середнє значення ІАМ, $M \pm m$
	<i>L. plantarum</i> 8R-A3	<i>L. acidophilus</i> KS 400	<i>L. reuteri</i> DSM 17938	
Індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ)				ІАМ, $M \pm m$
Букальний епітелій	$4,4 \pm 0,18$	$4,31 \pm 0,02$	$5,18 \pm 0,03$	$4,63 \pm 0,09^*$
Еритроцити 0 (1)	$2,42 \pm 0,05$	$2,57 \pm 0,04$	$3,02 \pm 0,03$	$2,67 \pm 0,21$

Примітка: \*  $p < 0,001$  - зміни достовірні щодо показників індексу адгезивності до еритроцитів

Підсумовуючи дані щодо антагоністичних та адгезивних властивостей, можна відзначити, що вони є більшою мірою штамовою ознакою, ніж видовою.

Отримані результати показують і підтверджують, що саме лактофлора значною мірою визначає стійкість слизових травного та генітального тракту до

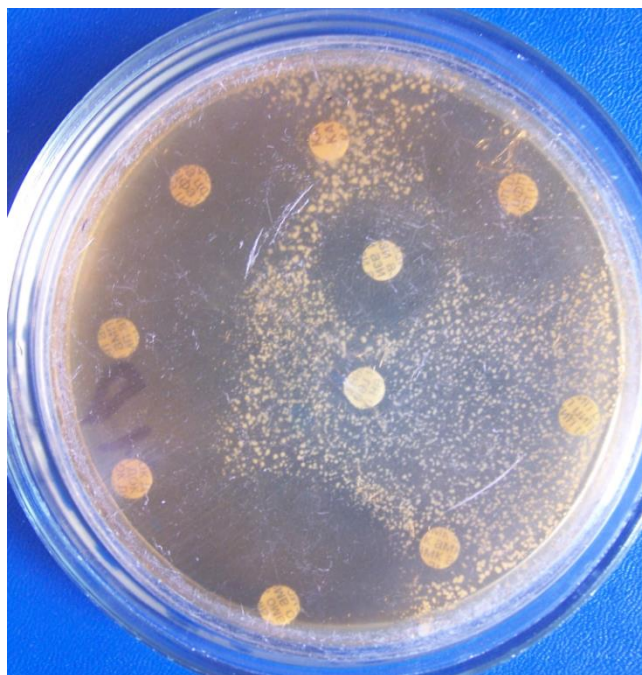
колонізації сторонніми мікроорганізмами (ентеробактеріями, псевдомонадами, грибами роду *Candida* та іншими мікроорганізмами) [244].

### **3.2.4. Чутливість до протимікробних препаратів індигенних ізолятів лактобацил та лактобацил - складників біопрепаратів**

Одним із шляхів підвищення ефективності протимікробної терапії при інфекційних запальних процесах є поєднане використання антибактерійних препаратів з пробіотичними препаратами. Важливим питанням є вибір комплексу препаратів в залежності від вибірковості їхньої дії, фармакокінетичних характеристик та послідовності застосування.

Можливість одночасного застосування пробіотиків з протимікробними препаратами вимагає наявності у них резистентності до відповідних антибіотиків.

Наступним етапом дослідження було вивчення чутливості до антимікробних препаратів лактобацил (рис. 3.19), що заселяють природні екологічні ніші людського організму – слизові оболонки ротоглотки, вагіни та кишечника [230, 231, 235].



**Рис. 3.19. Чутливість *Lactobacillus spp.* до протигрибкових препаратів**



Оскільки лактобацили є грампозитивними бактеріями, визначалась чутливість до відповідних груп антибіотиків. Результати цього дослідження наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

**Чутливість до антимікробних препаратів лактобацил, виділених із ротоглотки та кишечника (мм)**

	Вид лактобацил							
	<i>L. acidophilus</i>		<i>L. rhamnosus</i>		<i>L. plantarum</i>		<i>L. fermentum</i>	
	ротоглотка n=1	кишка n=24	ротоглотка n=6	кишка n=4	ротоглотка n=3	кишка n=6	ротоглотка n=5	кишка n=5
Пеніцилін	18,7±0,9	20,3±0,4	19,7±0,7	19,0±1,8	17,0±1,3	13±0,2	16,0±0,8	22,6±2,3
Ампіцилін	33,0±0,9	25,2±0,1	22,0±0,3	24,2±1,8	29,0±1,4	24,0±0,4	30,0±1,7	25,0±1,1
Оксацилін	0	0	0	0	0	0	0	0
Амоксицилін	27,4±0,5	27,2±0,2	27,3±0,5	26,0±2,1	26,0±1,4	27,0±1,4	27,4±0,6	22,4±1,4
Цефалексин	12,0±0,9	12,2±0,1	21,0±0,5	11,8±1,1	14,0±1,3	14,0±0,8	12,0±0,6	11,8±0,6
Цефтріаксон	24,0±0,9	23,2±0,3	24,3±0,5	22,5±0,4	9,3±0,5	16,3±1,6	22,6±3,3	23,0±0,3
Цефотаксим	23,4±1,4	23,4±0,5	23,3±0,5	24,3±0,7	14,3±0,5	14,3±0,2	23,0±1,4	24,0±1,1
Цефпіром	17,3±1,5	11,3±1,1	0	15,0±0,4	0	10,0±0,9	11,0±0,6	16,2±0,7
Еритроміцин	23,7±1,9	17,6±0,1	23,7±0,5	15,0±1,3	24,0±1,9	22,3±2,1	23,0±2,0	17,6±1,4
Рокситроміцин	24,3±1,9	17,5±0,1	25,0±0,6	17,0±1,3	23,0±0,3	20,0±1,4	25,0±0,3	17,2±1,0
Азитроміцин	16,7±0,5	18,5±0,1	18,7±1,4	15,0±0,4	16,7±1,3	16,7±1,1	18,6±1,4	27,4±1,7
Стрептоміцин	7,0±0,6	11,7±0,8	5,8±0,4	12,3±0,4	6,0±0,3	6,3±0,3	7,0±0,3	12,0±1,1
Канаміцин	0	12,2±0,2	0	7,0±0,1	0	7,8±0,4	0	10,2±0,6
Гентаміцин	0	8,8±0,6	0	8,3±0,4	0	11,7±0,7	0	17,6±0,8
Амікацин	0	10,2±0,4	0	13,0±0,4	10,0±0,4	10,3±0,2	0	10,2±0,8
Тетрациклін	22,0±0,9	23±0,1	20±0,3	22,0±2,0	23,0±1,8	21,3±1,9	20,0±0,8	24,2±0,6
Доксициклін	24,3±1,4	17,6±0,4	24,2±1,2	19,0±1,1	19,0±1,3	20,0±0,1	24,2±1,7	17,8±0,3
Кліндаміцин	21,3±1,9	15,4±0,1	22±2,1	18,0±1,1	25,0±1,4	18±0,5	22,0±0,3	15,0±0,3
Лінкоміцин	31,1±2,8	19,4±0,2	31,2±0,2	20,0±0,4	30,0±1,9	26±0,9	31,2±1,4	22,6±1,1
Ципрофлоксацин	0	8,4±0,8	0	9,0±0,8	0	7,3±0,2	0	10,0±0,6
Левовфлоксацин	0	11±0,6	14,3±0,7	0	0	9,3±0,5	15,0±1,1	12,0±0,3
Ванкоміцин	0	0	14±0,2	0	0	0	0	0

Слід відзначити закономірну тенденцію в абсолютній резистентності як у пробіотичних, так клінічних штамів лактобацил до оксациліну. Відмінність у чутливості до антибіотиків відповідних клінічних ізолятів лактобацил стосується культур *L. plantarum*, які були менш чутливими до пеніциліну (як “ротоглоткові”

так і “кишкові” штами), зони затримку їхнього росту складали  $17\pm 1,3$  і  $13\pm 0,2$  мм, а також – до цефалоспоринів III покоління, а до цефпірому вказані ізоляти виявились стійкими і слабчутливими порівняно з іншими видами лактобацил. Помірну чутливість до цефалоспоринів IV покоління виявлено у «ротоглоткових» ізолятів *L. acidophilus*  $17,3\pm 1,5$  мм та «кишкових» *L. fermentum*  $16,2\pm 0,7$  мм і *L. rhamnosus*  $15,0\pm 0,4$  мм.

Таблиця 3.6

**Чутливість до антимікробних препаратів пробіотичних штамів лактобацил  
(мм)**

Пробіотичні штами	L. plantarum 8R-A3	L. acidophilus KS 400	L. plantarum P17630	Пробіотичні штами	L. plantarum 8R-A3	L. acidophilus KS 400	L. plantarum P17630
Ванкоміцин	0	-	0	Азитроміцин	0	0	0
Пеніцилін	0	$17\pm 1,1$ #	-	Стрептоміцин	0	0	0
Ампіцилін	$12,3\pm 0,7$	$24,5\pm 1,1$ **	$19,6\pm 1,4$	Канаміцин	0	0	0
Оксацілін	0	0	0	Гентаміцин	0	0	0
Амоксицилін	$18,5\pm 1,4$	0 **	$31,0\pm 1,8$	Амікацин	0	0	0
Цефалексин	$11\pm 0,8$	$16,3\pm 0,7$ #	-	Тетрациклін	0	0	0
Цефтріаксон	$14,0\pm 0,7$	-	$26,0\pm 1,1$ #	Доксициклін	$9,8\pm 0,4$	0	$12,2\pm 0,6$ ***
Цефепім	$8,5\pm 0,4$	-	$26,2\pm 0,3$ #	Лінкоміцин	0	-	0
Еритроміцин	$15,8\pm 0,4$	-	$12,3\pm 0,9$ **	Ципрофлоксаци	0	-	0
Рокситроміцин	$20,8\pm 1,1$	-	$19,6\pm 1,0$ #	Левовлоксацин	0	-	0

Примітка. Вірогідність відмінностей показників чутливості клінічних ізолятів стосовно пробіотичних штамів: \*\* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  - зміни статистично достовірні; # -  $p > 0,05$  – зміни не є статистично достовірними

Фторхінолонові препарати проявляли різну дію на клінічні штами лактобацил. До ципрофлоксацину виявили стійкість клінічні ізоляти лактобацил, виділені з ротоглотки, а «кишкові» показали слабку чутливість в межах  $7,3\pm 0,2$  до  $10,0\pm 0,6$  мм. Щодо левофлоксацину лише ізоляти *L. plantarum* і *L. fermentum*, виділені з ротоглотки, були слабчутливими ( $14,3\pm 0,7$  та  $15,0\pm 1,1$  мм відповідно), з “кишкових” ізолятів *L. acidophilus* та *L. fermentum* виявили мінімальну чутливість -  $11\pm 0,6$  і  $12,0\pm 0,3$ мм.

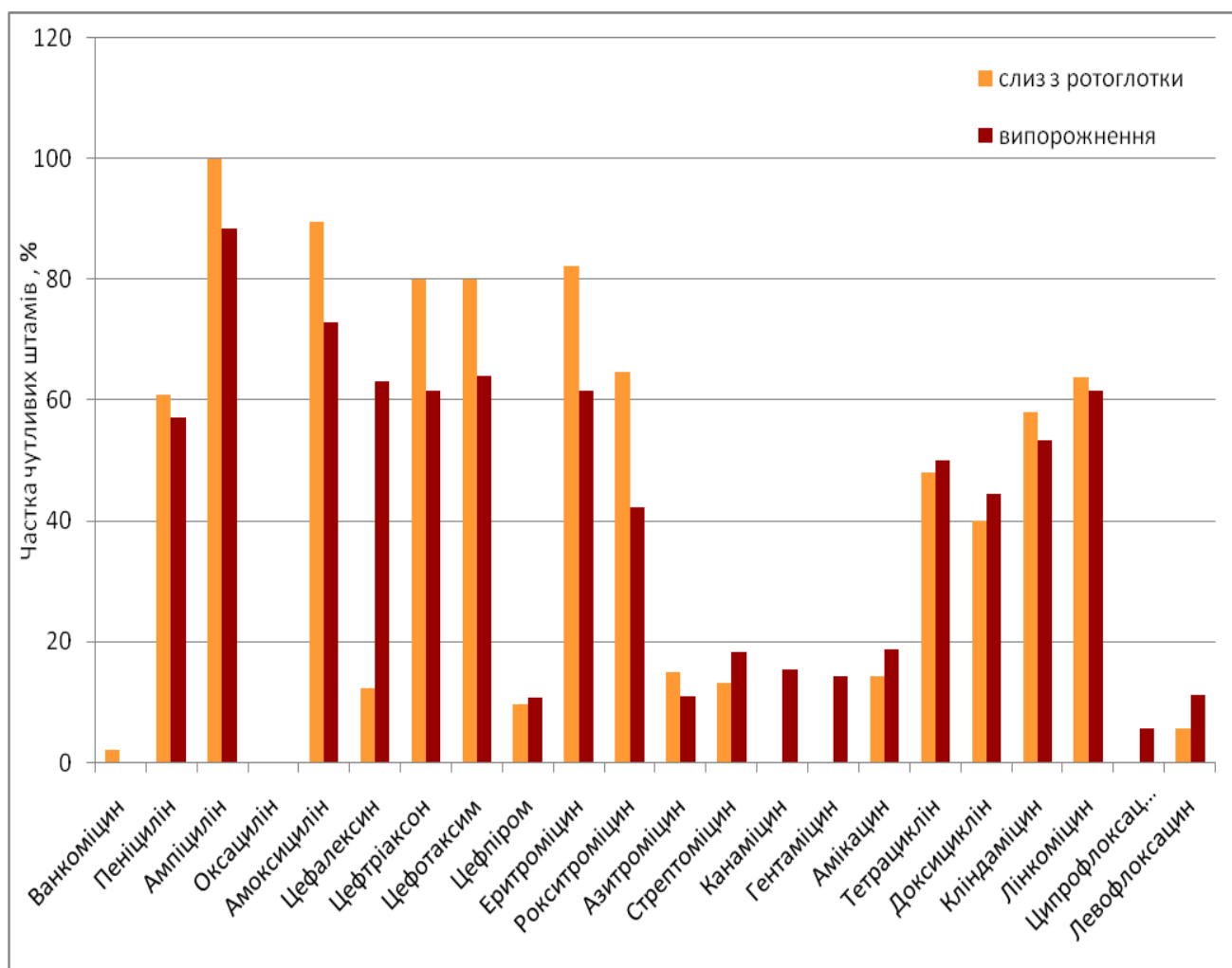
Чутливим до глікопептидів з досліджуваних штамів був лише *L. rhamnosus*, ізольований з ротоглотки, він виявився помірночутливим до ванкоміцину із зоною затримки  $14\pm 0,2$  мм.

Окрім того, як і промислові штами лактобацил, так і клінічні ізоляти, незалежно від виду, виявили стійкість до аміноглікозидів (табл. 3.6).

Аналіз середніх абсолютних значень чутливості дає змогу відмітити вищі показники чутливості у клінічних штамів лактобацил ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ) до антибіотиків в порівнянні з промисловими та практично однакові показники резистентності до препаратів, а саме оксациліну, аміноглікозидів, фторхінолонів, ванкоміцину ( $p>0,05$ ). Результати наведені в таблиці 3.6.

Для аналізу відмінностей у чутливості до антибіотиків ізолятів із екологічних ніш – ротоглотки і товстої кишки – відповідні показники було сумовано за видовою ознакою. Виявлено відмінності у показниках чутливості до протимікробних препаратів ізолятів із різних мікроєкосистем.

Відповідно до процентного розподілу ізолятів за рівнем чутливості до різних протимікробних препаратів, лактобацили, висіяні із ротоглотки та кишечника, суттєво відрізняються (рис. 3.20).



**Рис. 3.20. Чутливість до антибактерійних засобів лактобацил, виділених з різних екологічних ніш (ротоглотки та кишечника)**

Зокрема, «ротоглоткові» ізоляти виявили вищу чутливість до препаратів пеніцилінового ряду (крім чутливості до оксациліну): абсолютна чутливість (100 %) зафіксована стосовно ампіциліну та для 88,5 % виділених штамів – для амоксициліну. Для «кишкових» штамів вказані показники становили відповідно 89,5 % та 72,8 %. Для цефалоспоринів III покоління цефтріаксону та цефотаксиму серед «ротоглоткових» штамів чутливих зразків зустрічалося більше (80 %), ніж серед «кишкових» (61,5 % та 64,1 %). За чутливістю виділених лактобацил до макролідів зафіксовано деякий зсув кращої ефективності вказаної групи антибіотиків у бік ізолятів із зіву, що в середньому складає 54% проти «кишкових» ізолятів у кількості 38,2%. Найменший відсоток

чутливих штамів лактобацили виявлено до глікопептидів (ванкоміцин) - лише 1,9 %.

Зареєстровано 100 % резистентність “роголоткових” штамів до гентаміцину і канаміцину та 85,7 % і 86,9 % відповідно - до амікацину і стрептоміцину. Проте серед “кишкових” культур до всіх апробованих аміноглікозидів (стрептоміцин, гентаміцин, амікацин) близько 50 % ізолятів були помірно чутливими.

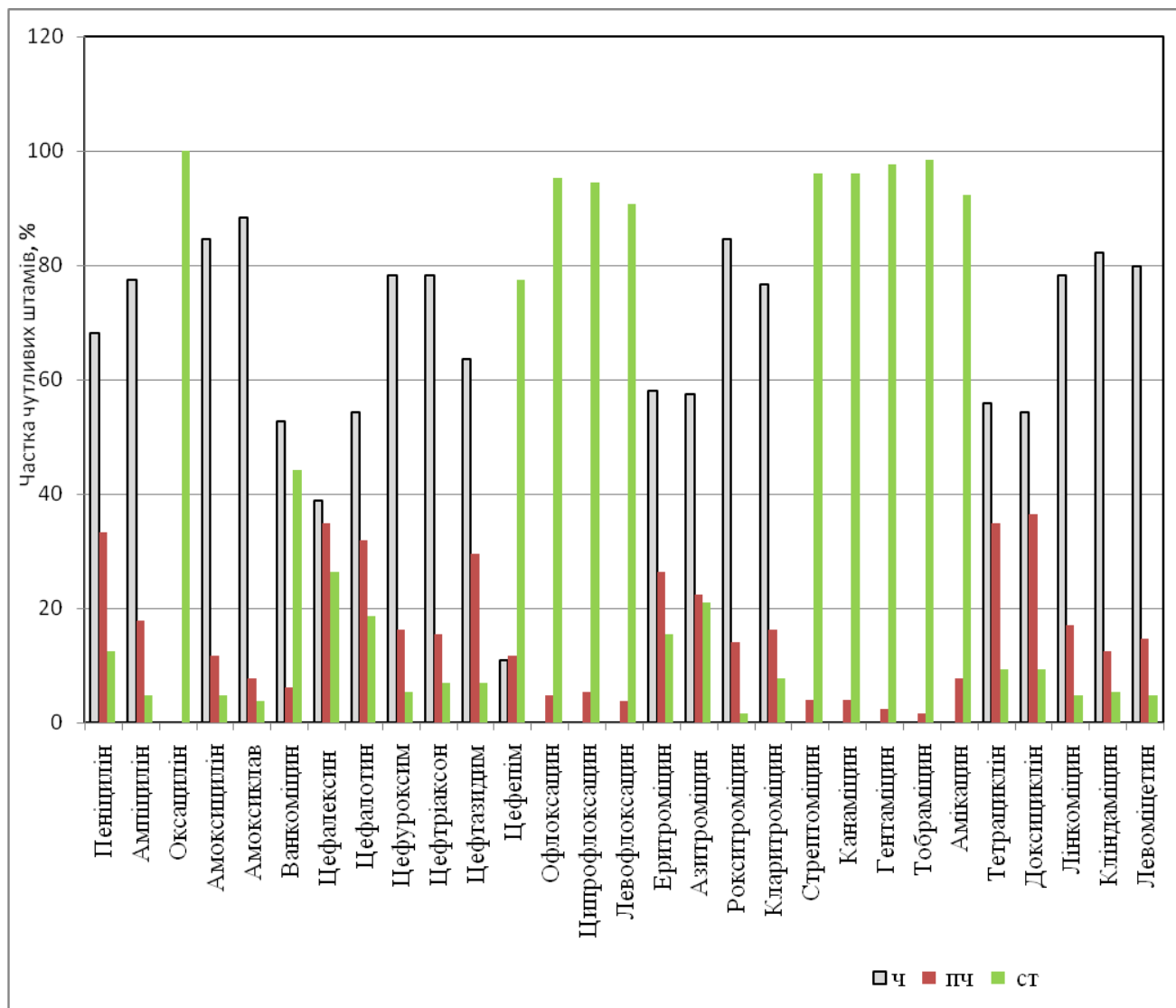
Антибіотики тетрациклінового ряду однаково пригнічували ріст ізолятів із кишки та зіву. Незначна перевага у чутливості до лінкозамінів зафіксована для лактобацил із ротоглотки з різницею від 2 % до 5 %.

Позаяк, лактобацили є основними нормосимбіонтами вагінального тракту, які на фоні антибіотикотерапії різних урогенітальних захворювань, першими зазнають згубної дії протимікробних препаратів, вивчення їхньої чутливості є достатньо важливим. До вказаних видів лактобацил, що зустрічалися найчастіше у вагінальному тракті, встановлено чутливість до протимікробних препаратів. Результати цього дослідження подано на рисунку 3.21.

Як і лактобацили, виділені з зіву та кишечника, вагінальні штами не виявили чутливості до оксациліну, проте, до пеніцилінів їхня чутливість була в межах 68,2 %-88,4 %. Щодо аміноглікозидів, до яких малочутливі анаеробні мікроорганізми, зареєстровано абсолютну резистентність відносно гентаміцину, стрептоміцину, канаміцину та амікацину. Не виявлено чутливості лактобацил до фторхінолонів, які мають широкий спектр дії на аеробну грамнегативну та грампозитивну флору, середній показник помірночутливих штамів складав лише 4,6%.

Встановлено значний відсоток стійкості вагінальних штамів до інших антибіотиків-інгібіторів синтезу білка, зокрема до еритроміцину та азитроміцину 15,5 % і 21 %, чого, проте, не спостерігалось відносно кларитроміцину і рокситроміцину. На відміну від ротоглоткових і кишкових ізолятів чутливість вагінальних була в межах 80%. До антибіотиків

тетрациклінового ряду вагінальні штами, як ротоглоткові, так і кишкові, проявляли помірну чутливість (в середньому 35,7 % штамів лактобацил) та стійкість у 9,3 %.



**Рис. 3.21. Чутливість до антимікробних засобів лактобацил, виділених з вагіни**

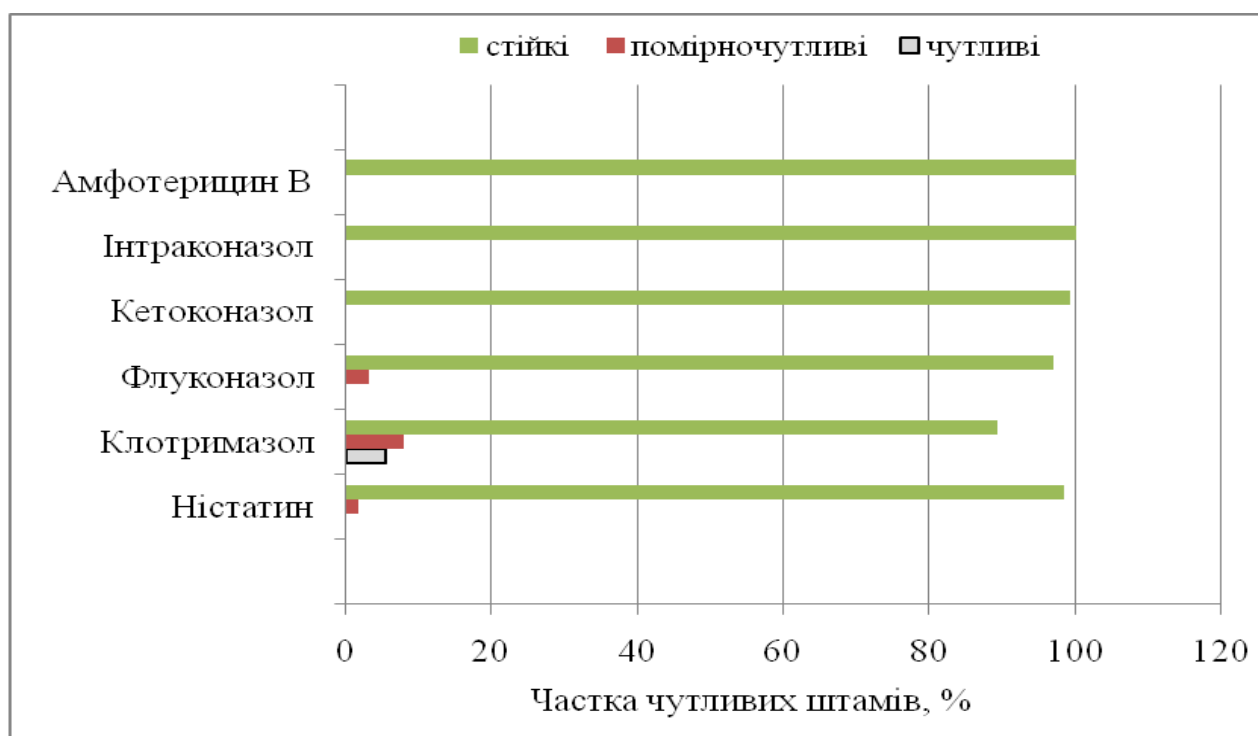
Стосовно цефалоспоринів, ізоляти лактобацил як вагінальні, так і ротоглоткові та кишкові мали значну чутливість до препаратів III покоління (цефтріаксону) 78,3 %, 80,0 %, 61,5 % відповідно, тоді як до IV покоління вона знаходилась в межах від 9,5 % до 10,9 %. До цефалоспорини I покоління

(цефалексин) різною мірою були чутливими досліджувані штами: вагінальні ізоляти 38,8 %, ротоглоткові – 12,3 %, кишкові – 63,2 %.

Аналізуючи чутливість до глікопептидів (ванкоміцин) лактобацил з різних екологічних систем, встановили, що значну частину чутливих ізолятів 52,7 % складала лактобацили, виділені з вагіни проти 1,9 % «ротоглоткових ізолятів», відтак різниця становила у 27,7 рази.

Є повідомлення в літературі, що деякі види лактобацил можуть бути чутливими до антимікотиків [245], зокрема до клотримазолу, який застосовують при урогенітальних кандидозах [230, 231].

З усіх виділених лактобацил до протигрибкових препаратів, зокрема клотримазолу, виявили чутливість 5,4 % і помірну чутливість 7,8 % (рис. 3.22).



**Рис. 3.22. Чутливість до протигрибкових засобів лактобацил, виділених з вагіни**

Нами було підтверджено, що 28 % чутливих та 20 % помірно чутливих штамів припадало на *L. plantarum*. Частка чутливих до ністатину і флуконазолу штамів складала відповідно 3,1 % і 1,6 %.

Одержані результати можуть бути підґрунтям для уточнення відомих схем лікування запальних процесів на слизових оболонках різної локалізації і враховування видового складу біопрепаратів для підвищення ефективності комбінованої протимікробної терапії.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [230-238].



#### РОЗДІЛ 4. Взаємодія індигенних штамів лактобацил із штамми лактобацил – складників еубіотиків - *in vivo*

Найпотужніший негативний вплив на мікробну екосистему серед медикаментозних засобів мають антибіотики та їхнє часто неадекватне застосування, особливо з профілактичною метою [246].

Моделювання експериментального дисбактеріозу у лабораторних тварин необхідне для вивчення характеру змін складу і властивостей кишкової мікробіоти, біосумісності між індигенними та інокульованими штамми лактобацил, а також для обґрунтування підходів до корекції мікроекологічних порушень [247].

Дослідження проводили на моделі білих безпородних мишей-самців масою 18-22 г, яких утримували в стандартних умовах у відповідності з правилами Європейської конвенції по захисту хребетних тварин. Фізіологічні потреби в харчуванні мишей забезпечувались стандартним раціоном: зерна пшениці і вівса, морква, сухарі, листя капусти, вода. Для створення експериментального дисбактеріозу було вибрано антибіотики широкого спектру дії - лінкоміцин та ципрофлоксацин. Лінкоміцин має протимікробну дію на грампозитивну аеробну і анаеробну мікробіоту, і, як було нами виявлено, в тому числі на представників нормофлори (*Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.*). Ципрофлоксацин є ефективнішим щодо грамнегативних мікроорганізмів. Усім мишам вводили доочеревинно антибіотики з розрахунку на 1 кг маси: лінкоміцин та ципрофлоксацин по 0,4 мг впродовж трьох днів. Після введення антибіотиків мишей (n=27) поділили на чотири групи, яким до основного харчового раціону додавали: першій групі мишей (контроль, n=6) стерильний фізіологічний розчин; другій групі (n=7) – автоштами лактобацил; третій (n=7) – пробіотичні штами лактобацил пробіотиків; четвертій (n=7) - суміш авто- та пробіотичних штамів лактобацил, n=7 (1:1).

Забір фекалій для оцінки мікробіоти проводили (4 рази) до- і після введення антибіотиків, після 10-денної біокорекції та через 13 днів (період відновлення).

Для відновлення мікробіоти мишам згодовували разом з кормом щоденного раціону суспензію лактобацил у кількості 1 мл густиною  $10^7$  мкр.тіл/мл десять днів поспіль. Корекцію дисбактеріозу проводили пробіотичним препаратом «Лактобактерин» (Біофарма, Київ).

У ході експериментально створеного антибіотико-асоційованого дисбактеріозу середовище кишечника білих мишей зазнало значних мікроекологічних змін. У досліджуваних тварин під впливом антибіотиків виявлено виражені пептичні розлади, які супроводжувались здуттям живота та порушенням перистальтики кишечника. Поведінка тварин була дещо змінена вони були в'ялими, збирались у групу і відмовлялись від їжі, багато пили, у всіх мишей спостерігалось розм'якшення калу. Така поведінка тварин найдовше спостерігалась у мишей 1-ої групи до 9-го дня після відміни антибіотиків та у 2-ої груп до 7-го дня. У мишей 3-ої та 4-ої групи на 5-6-й день зафіксовано поступове відновлення порушених функцій.

Наступним етапом дослідження було визначення маси тіла впродовж усього експерименту. Маса мишей від початку експерименту зменшилась у  $1,19 \pm 0,38$  рази, летальних випадків серед тварин не зафіксовано.

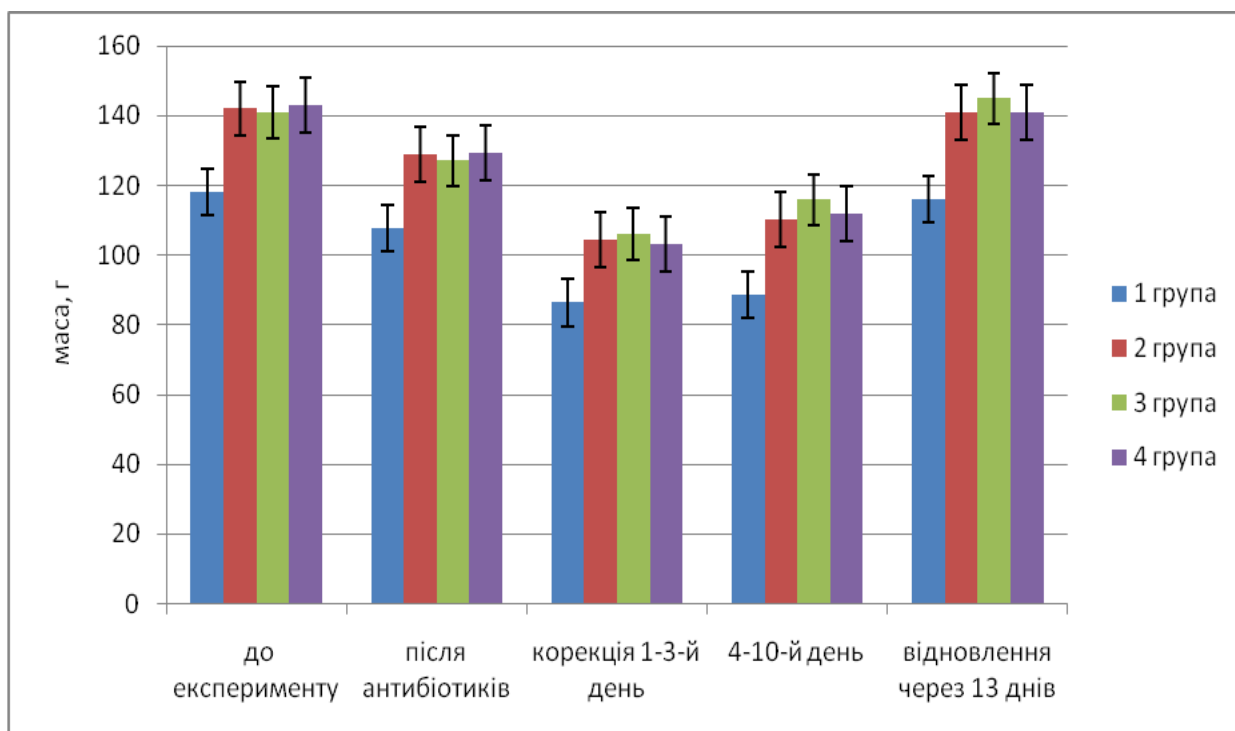
Різниця у масі тварин 2-ої, 3-ої та 4-ої груп після введення антибіотиків були незначною і становила  $129,0 \pm 8,01$  г,  $127 \pm 6,6$  г,  $129,33 \pm 9,9$  г відповідно, а маса однієї особини у групах була в межах від 16,86 до 17,29 г (рис. 4.1).

У контрольній групі маса мишей до експерименту складала 118 г (в середньому маса однієї особини  $19,67 \pm 0,47$  г), після трьохденного введення антибіотиків маса  $107,67 \pm 7,07$  г (маса однієї особини  $17,94 \pm 1,18$  г) та впродовж трьох днів після відміни антибіотиків маса знизилась до  $86,33 \pm 6,13$  г (маса однієї особини  $14,39 \pm 1,02$  г) ( $p < 0,05$ ).

Процентні показники втрати маси тіла тварин контрольної групи у порівнянні з вихідними значеннями становили 26,84%, 2-ої групи – 26,53%, 3-ої – 24,82% та 4-ої – 27,97%.

Аналізуючи коливання маси тіла мишей у групах (2-4) потрібно зазначити, що після відміни антибіотиків їхня маса знижувалась ( $p < 0,05$ ) ще

протягом трьох днів під час корекції як аутоштамами лактобацил, так і пробіотичними, і дорівнювала  $104,33 \pm 6,13$  г,  $106 \pm 5,19$  г,  $103 \pm 5,19$  г відповідно.



**Рис. 4.1.** Коливання маси тіла мишей впродовж експерименту

Середні показники зростання маси тіла мишей у всіх групах з 4-го по 10-й день корекції проти даних 1-3-го дня корекції виявились незначними ( $p > 0,05$ ): у 2-ої групи –  $110,14 \pm 4,44$  г, 3-ої –  $115,86 \pm 5,05$  г, 4-ої –  $112 \pm 5,25$  г і у контрольній групі він був найменшим і дорівнював  $88,71 \pm 3,03$  г проти маси  $86,33 \pm 6,13$  г. Однак, порівнюючи середні результати приросту маси тіла однієї особини на 3-й день (1-а група  $13,33 \pm 0,24$  г, 2-а –  $14 \pm 0,6$  г, 3-я –  $14,43 \pm 0,4$  г, 4-а –  $14 \pm 0,2$  г) і 10-й день корекції (1-а група  $16,17 \pm 0,24$  г, 2-а –  $17,43 \pm 0,61$  г, 3-я –  $18,43 \pm 0,4$  г, 4-а –  $18 \pm 0,4$  г) зафіксовано достовірне зростання маси ( $p < 0,001$ ).

Виходячи з отриманих даних, потрібно зауважити, що у контрольній групі на рівні з групами, які отримували біокорегуючі препарати, теж відбувалось збільшення маси тіла тварин.

У відновлювальний період через 13 днів після корекції відмічено зростання показників до вихідних результатів маси тіла по групах, причому у 3-й

групі, якій проводили корекцію пробіотичними штамми, спостерігалось найбільше зростання показника, ніж до експерименту.

При порівнянні маси мишей дослідних груп у період корекції за 1-3-й день, встановлено, що маса контрольної групи та 2-ої втратили найбільший відсоток маси - 13,98% та 11,71%, 3-я та 4-а групи відповідно 9,82% і 10,09%. Оцінюючи співвідношення маси груп за час з 4-го по 10-й день корекції встановлено приріст у 1,18 разів в контрольній групі, у 1,22 рази в 2-ій групі, у 1,24 рази в 3-ій групі та 1,26 разів в 4-ій групі.

Потрібно вказати, що середнє зростання маси серед контрольної групи у відновлювальний період (на 13-й день) по відношенню до 4-го дня корекції становило 1,41 рази, як у 2-ій та 4-ій групах, а у 3-ій групі – у 1,39 рази. Отже, у контрольній групі темпи збільшення маси були більш виражені у період відновлення.

Впродовж експерименту спостерігалась майже однакове зростання маси тіла контрольної та 2-ої групи, яка отримувала корекцію аутоштамами лактобацил, хоча незначно переважала у набиранні маси 2-а група. А тенденція приросту маси у 3-ій та 4-ій групі була майже на одному рівні.

Після триденного доочеревинного введення лінкоміцину та ципрофлоксацину в мишей відбирали фекалії для бактеріологічного дослідження. Для оцінки мікробіоценозу обрано кількісні показники основних представників фекальної мікробіоти білих мишей. У всіх мишей спостерігалась повна елімінація *E. coli* та *Bifidobacterium spp.* у порівнянні з показниками до початку експерименту ( $5,37 \pm 0,07$  та  $6,32 \pm 0,09$  Іг КУО/г відповідно). Встановлено значне зменшення кількості *Lactobacillus spp.* -  $1,67 \pm 0,38$  проти  $7,29 \pm 0,09$  Іг КУО/г. Деяко знизився кількісний рівень стафілококів - на  $1,1$  Іг КУО/г, проте зафіксовано зростання кількості ентерококів на  $0,59$  Іг КУО/г та встановлено появу грибів роду *Candida* до  $2,01 \pm 0,4$  Іг КУО/г за відсутності їх до експерименту (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

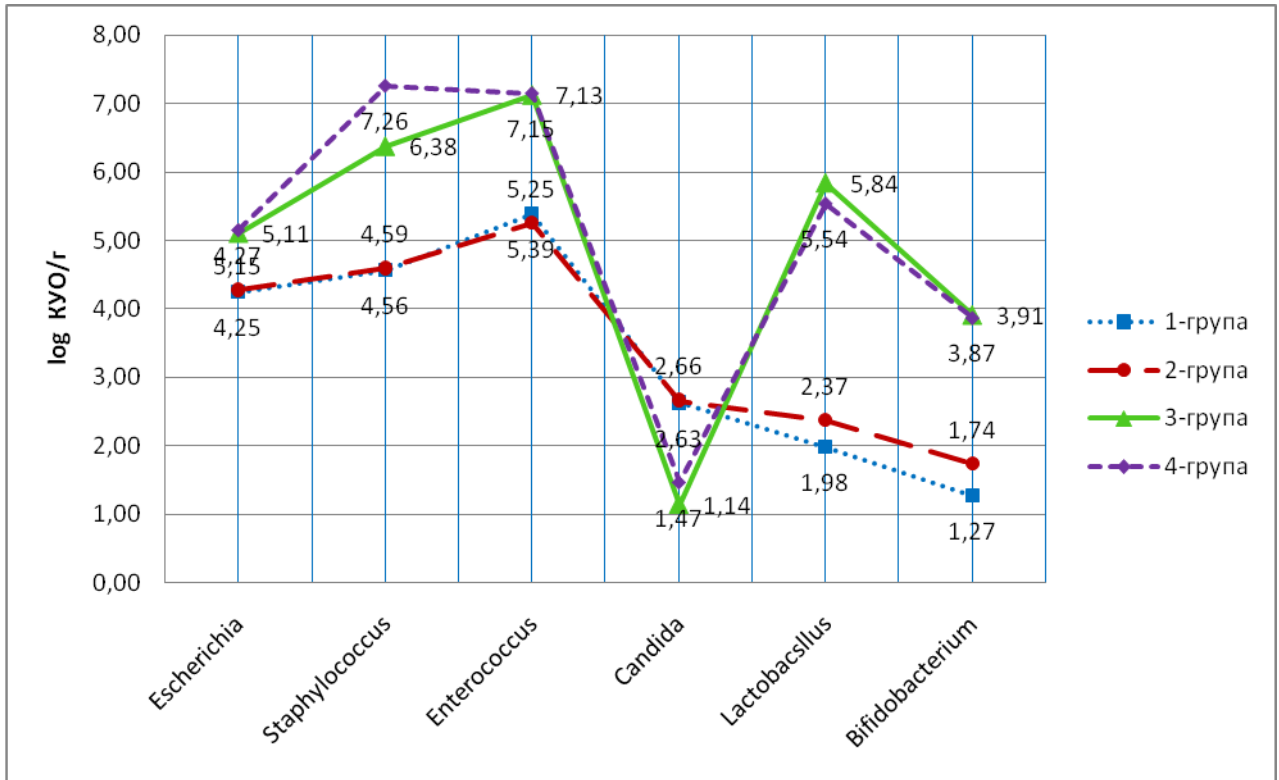
**Стан мікробіоти кишечника мишей за умов антибіотикоасоційованого дисбіозу**

Мікроорганізми	Популяційний рівень мікроорганізмів (lg КУО/г)		
	До введення антибіотиків	Після введення антибіотиків	
<i>Escherichia coli</i>	5,37±0,07	0	p<0,05
<i>Staphylococcus spp.</i>	4,59±0,09	3,49±0,34	p<0,05
<i>Enterococcus spp.</i>	5,17±0,03	5,76±0,17	p<0,05
<i>Candida spp.</i>	0	2,01±0,4	p<0,05
<i>Lactobacillus spp.</i>	7,29±0,09	1,67±0,38	p<0,05
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,32±0,09	0	p<0,05

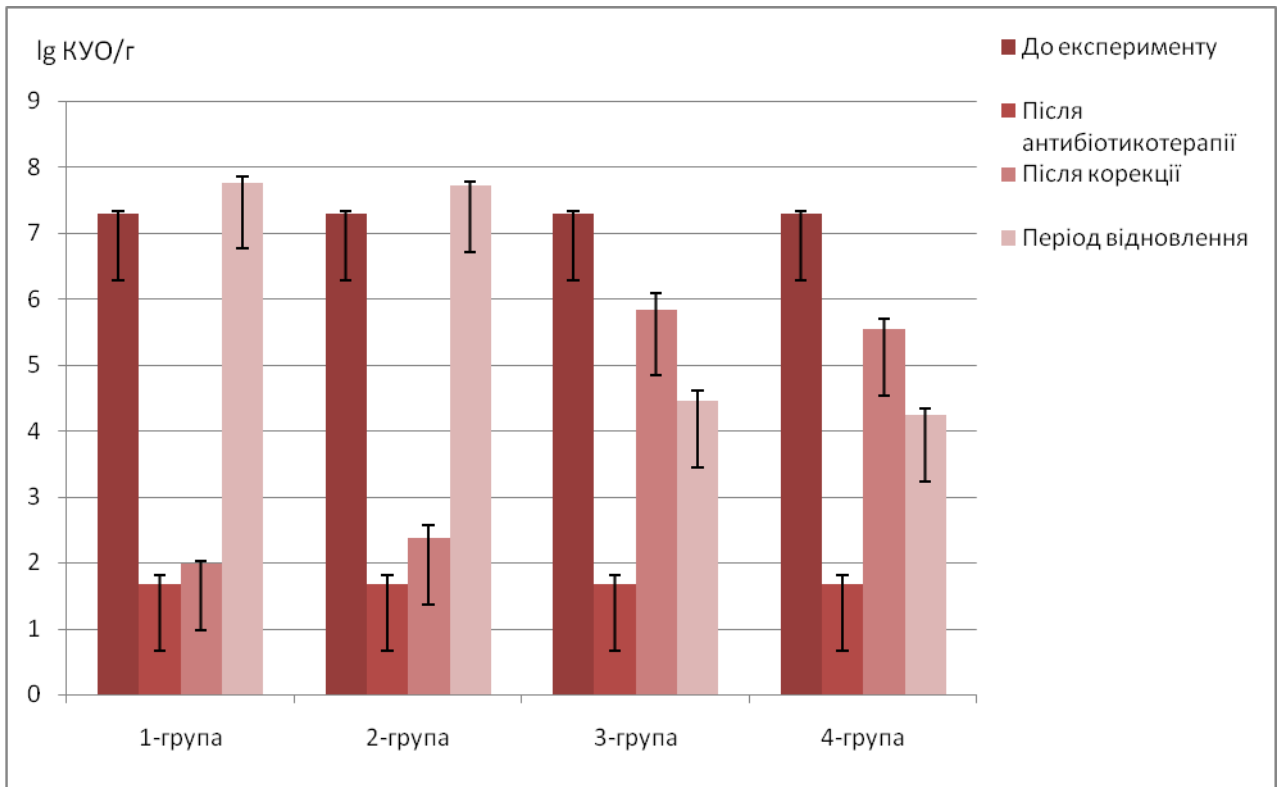
Зниження кількісного рівня нормосимбіонтів пов'язано не лише з прямою антимікробною дією антибіотиків, але й посиленням елімінації через розвиток діарейного синдрому, дефіцитом травної функції за рахунок порушення всмоктувальної функції кишечника.

Після введення антибіотиків тваринам дослідних груп проводили корекцію індигенними та пробіотичними лактобацилами впродовж 10-ти днів. Встановлено, що імплантація автоштамів лактобацил мало сприяє відновленню мікробіоти (рис. 4.2, 4.3), оскільки за результатами досліджень у 1- та 2-ій групах тварин кількісні показники усіх досліджуваних мікроорганізмів практично не відрізняються ( $p>0,05$ ).

Характерним для обох груп є незначне зростання кількості молочнокислих бактерій *Lactobacillus spp.* до 1,98±0,05 і 2,37±0,2 та *Bifidobacterium spp.* 1,27±0,05 і 1,74±0,03 lg КУО/г, виявлення стафілококів і ентерококів у тій же кількості, яка мала місце до початку експерименту та появу грибів роду *Candida* ( $p<0,05$ ). Кількість *E. coli* не досягла вихідного рівня і становила 4,25±0,13 lg КУО/г ( $p<0,05$ ).



**Рис. 4.2. Стан мікробіоти кишечника мишей після 10-денної корекції пробіотиками**

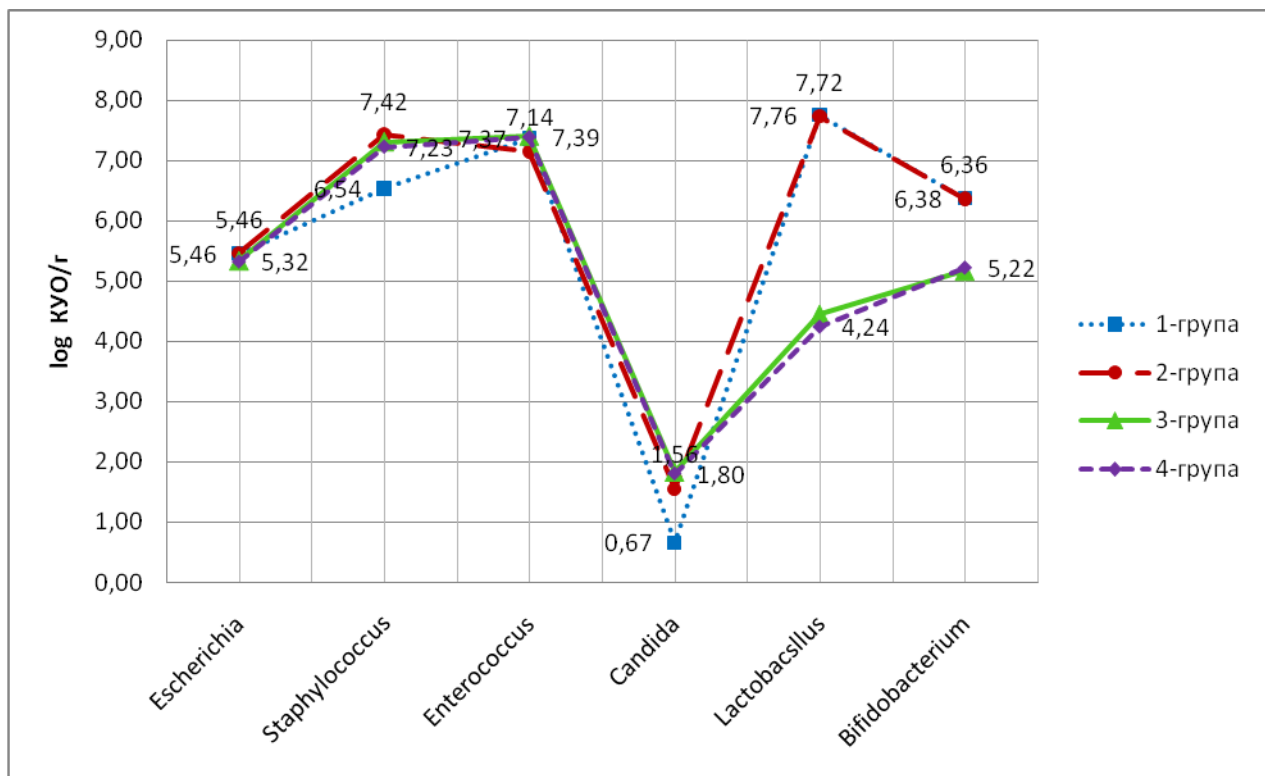


**Рис. 4.3. Кількісні рівні *Lactobacillus spp.* кишечника мишей у різні періоди експерименту за умов антибіотикоасоційованого дисбіозу**

Як видно із представлених результатів, у 3-ій та 4-ій групі концентрація молочно-кислих бактерій у фекаліях після імплантації пробіотичних штамів суттєво зросла: *Lactobacillus spp.* до  $5,84 \pm 0,25$  та  $5,54 \pm 0,16$  ( $p < 0,05$ ), *Bifidobacterium spp.* до  $3,91 \pm 0,27$  та  $3,87 \pm 0,25$  lg КУО/г ( $p < 0,05$ ) відповідно. Але разом з тим зросла проліферація *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* та *E.coli* ( $p < 0,05$ ) і дещо знизилась кількість грибів роду *Candida* (рис. 4.2).

Незначна різниця у показниках усіх досліджуваних мікроорганізмів між 1-ою контрольною та 2-ою групою, тварини якої для корекції отримували тільки власні штами лактобацил, вказує на низьку ефективність відновлення нормофлори та формування у вигляді біоплівки мікробно-тканинного комплексу кишечника піддослідних тварин.

Для більш об'єктивної оцінки відновлення мікробіоти кишечника мишей у динаміці фекалії було відібрано через 13 днів після корекції або через 26 днів від початку експерименту (рис. 4.4).



**Рис. 4.4. Відновлення мікробіоти кишечника мишей  
(13 днів після корекції)**

Варто зазначити, що у 1-й та 2-й групах тварин відбулося поступове самовідновлення кишкової мікробіоти, але тривале у часі (через 13 днів після корекції): початкових значень вони досягають впродовж останніх днів у порівнянні із 3-ою і 4-ою групою, які отримували корекцію пробіотичними штамми і вже відновили початкові показники на 10-й день. У всіх чотирьох групах зафіксовано зростання кількості стафілококів та ентерококів ( $p < 0,05$ ).

Необхідно вказати, що кількісний рівень *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacterium spp.* у 3-й групі становив лише  $4,45 \pm 0,16$  та  $5,17 \pm 0,11$ , а в 4-й групі -  $4,24 \pm 0,1$  та  $5,22 \pm 0,13$  відповідно проти  $7,76 \pm 0,09$  та  $6,38 \pm 0,1$  lg КУО/г у 1-й групі і  $7,72 \pm 0,06$  та  $6,36 \pm 0,15$  lg КУО/г - у 2-й групі.

Упродовж експерименту з кишечника мишей виділено всього 37 штамів лактобацил. *L. acidophilus* – 45,95 % штамів, *L. brevis* – 13,51 %, *L. fermentum* – 16,22 %, *L. casei* – 10,81 %. У 24,32 % з них виділено по 2 штами лактобацил.

Нами і іншими дослідниками було відмічено, що при виділенні *L. acidophilus*, остання мала виражений антагоністичний ефект відносно грибів роду *Candida* [248].

Вище наведені результати експерименту контрольної групи мишей, вказують на достатньо високий потенціал макроорганізму у самовідновленні фізіологічних показників.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [247].



## **РОЗДІЛ 5. Активність лактобацил відносно планктонної та біоплівкової форми стафілококів.**

Бактеріальна біоплівка є специфічною формою існування мікроорганізмів на межі розділу фаз та характеризується властивостями, що відрізняються від особливостей існування сукупності клітин в чистій культурі [249].

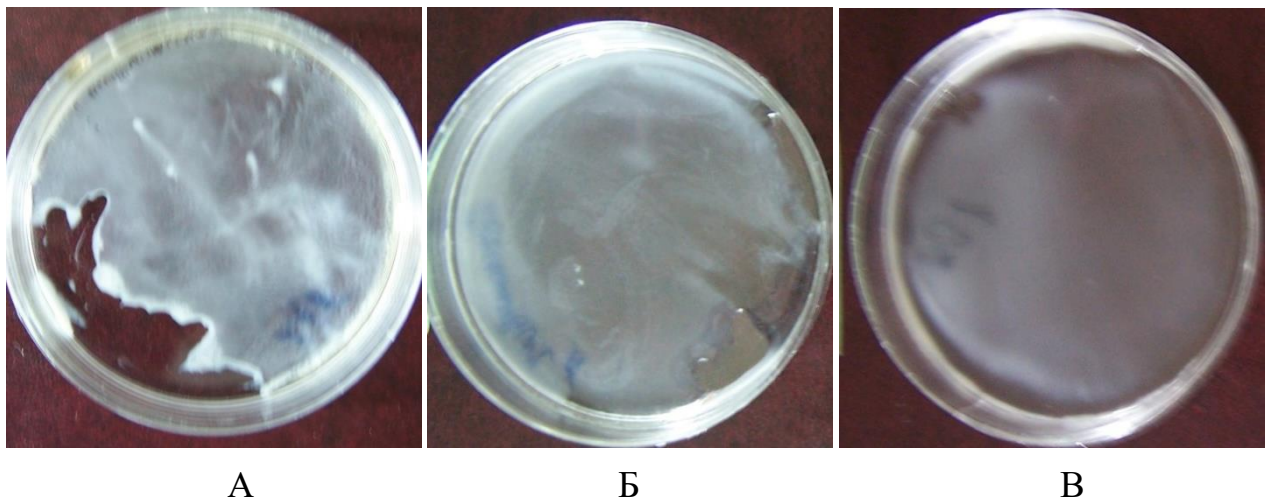
### **5.1 Формування біоплівки індигенними та пробіотичними штамами лактобацил**

Формування біоплівки у бактерій відбувається у кілька стадій. Дослідження динаміки цього процесу може бути корисним як при вивченні фізіологічних процесів на слизових оболонках, так і при розробці протимікробних препаратів відносно плівкоутворюючих культур.

Процес утворення біоплівки починається з прикріплення клітини до поверхні, що зумовлено неспецифічними механізмами адгезії. Ця взаємодія бактерії з поверхнею залежить від фізико-хімічних властивостей поверхні, таких, як текстура (шорстка або гладка), гідрофобність, рН і температура [249]. На цьому етапі адгезія може бути зворотною, позаяк клітини можуть від'єднатись від поверхні і перейти до планктонного способу існування. Наступним дуже важливим етапом є синтез мікроорганізмами екзополісахаридів, внаслідок чого взаємозв'язок між бактеріями і поверхнею стає незворотним, що призводить до серії морфологічних змін, які ведуть до утворення біоплівки [40, 250]. Далі відбувається активний ріст і розмноження мікроорганізмів та формування мікроколоній, внаслідок агрегації клітин. Значно зростає кількість синтезованого екзополісахариду, який заповнює міжклітинний простір, укріплює взаємозв'язок між бактеріями, стабілізує колонію від будь-якого стресу та в основному складає матрикс біоплівки [251]. На четвертій стадії біоплівка дозріває і розвивається (тривалістю 10 днів і більше) в організовану структуру, яка набуває різної форми в залежності від джерела поживних речовин [250]. На останньому етапі клітини біоплівки відокремлюються від колонії і транзиторно повертаються в планктонну форму, колонізуючи нові ніші [40].

Однією із важливих біологічних характеристик лактобацил є їхня здатність формувати біоплівку *in vivo*. Метою цього дослідження було вивчення здатності лактобацил формувати плівкоутворюючі структури *in vitro* для дослідження впливу саме плівкоутворювальної форми лактобацил, в якій перебувають учасники мікроекосистеми в організмі, на інші мікроорганізми.

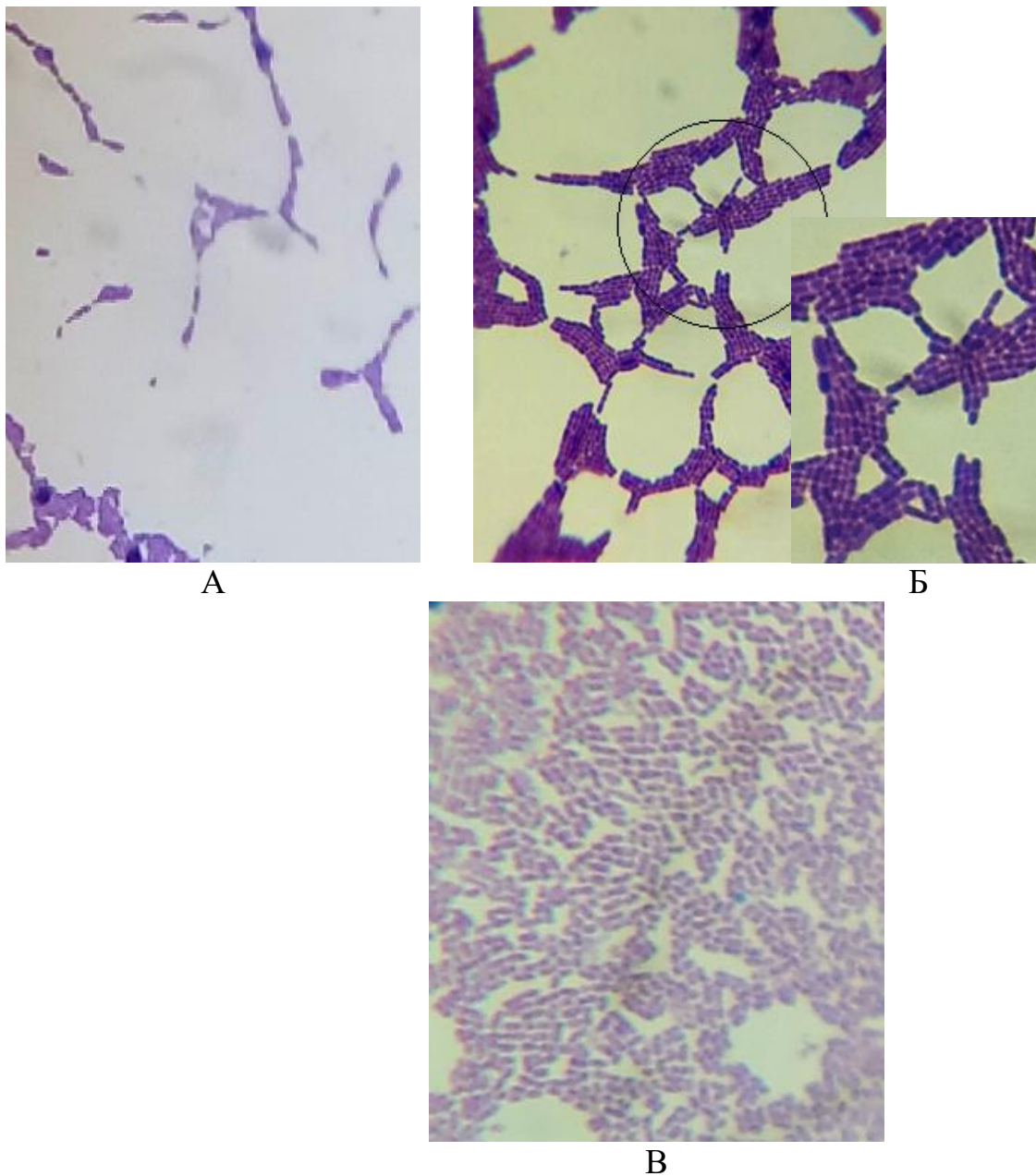
Культивування лактобацил проводили у середовищі MRS на абіотичних поверхнях полістиролу та скла (рис. 5.1). На рисунку спостерігається візуально найбільш інтенсивна плівка у пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 у порівнянні з клінічними ізолятами лактобацил вагіни і кишечника.



**Рис. 5.1.** Біоплівки лактобацил через 48 год: А - *L. plantarum* 8R-A3; Б - вагінальний ізолят *L. fermentum*; В - кишковий ізолят *L. acidophilus*.

Динаміку росту бактерійних культур на межі «тверда поверхня-рідина» спостерігали через 12, 24, 48 год за допомогою світлової мікроскопії (рис. 4.2). Утворення біоплівкової структури на межі розділу фаз через 12 год характеризувалося невеликою кількістю бактеріальних клітин (рис. 5.2, А), оскільки на першому етапі мікроорганізми адаптуються до навколишнього середовища та з'єднуються з поверхнею. Та вже через 24 год (рис. 5.2, Б) у полі зору виявляються ланцюжки лактобацил, які організуються у структуровані об'єкти - мікроколонії, що формують сітчасту будову. Впродовж 48 годин

прослідковуються тенденція до злиття мікроколоній із заповненням вільних проміжків у біоплівці та ущільнення біоплівки (рис. 5.2, В).



**Рис. 5.2.** Формування лактобацилами біоплівки у різних часових проміжках: А - через 12 год; Б - через 24 год, стрілкою вказаний фрагмент (масштаб 85 %); В - *L. plantarum* 8R-A3 через 48 год. Забарвлення генціанвіолеотом ( $\times 900$ ).

Слід зазначити, що при порівнянні поля зору приготованих препаратів-мазків з чистих культур (розділ 3, рис. 3.5) та поля зору сформованої

зафіксованої біоплівки, в останній спостерігаються організовані структуровані елементи, на відміну від хаотично розташованих бактеріальних клітин в препараті.

## 5.2. Моделювання біоплівки при сумісному культивуванні у змішаних культурах лактобацил та стафілококів

Останніми роками низьку ефективність протимікробної терапії багатьох хронічних захворювань пояснюють утворенням мікроорганізмами біоплівкових форм.

Для підвищення ефективності протимікробної терапії захворювань, спричинених стафілококами, ведеться пошук засобів, які б дали змогу дезінтегрувати біоплівку. Антибактеріальна активність лактобацил зумовлена продукцією метаболітів, які можуть бути ефективними антагоністами в умовах біоплівки.

Метою цього дослідження є вивчення взаємодії бактерій у біоплівці, утвореній змішаною культурою – стафілококами, виділеними з клінічного матеріалу, та лактобацилами, методом інтерференційної (диференційно-інтерференційний контраст – DIC) мікроскопії з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії [252, 253].

Обстежено 69 осіб з *acne vulgaris*. Із гною пустул, які утворюються на шкірі хворих, ізолювано 36 штамів стафілококів (52,17 %), що за культуральними властивостями (підвищена в'язкість біомаси колонії) первинно могли належати до плівкоутворюючих форм: 15 ізолятів *S. aureus* (41,67 %) та 21 – *S. epidermidis* (58,33 %).

Для відбору біоплівкоутворювальних стафілококів проведено вимірювання оптичної щільності їхніх біоплівок. У таблиці 5.1 представлено оптичну щільність біоплівок *S. aureus* і *S. epidermidis* у моно- та бівидових культурах.

Біоплівки однаково утворювали ізоляти як *S. aureus*, так і *S. epidermidis*. Показники оптичної щільності утворених структур дають змогу характеризувати біоплівку як таку, що має високу щільність ( $\geq 1$ ). При цьому щільність 24-годинної біоплівки золотистого й епідермального стафілококів ( $1,69 \pm 0,01$  та  $1,50 \pm 0,007$  од.) статистично не відрізнялася ( $p > 0,05$ ).

Таблиця 5.1

**Оптична щільність біоплівок стафілококів *in vitro* в монокультурі та у змішаній культурі з *L. plantarum* 8R-A3**

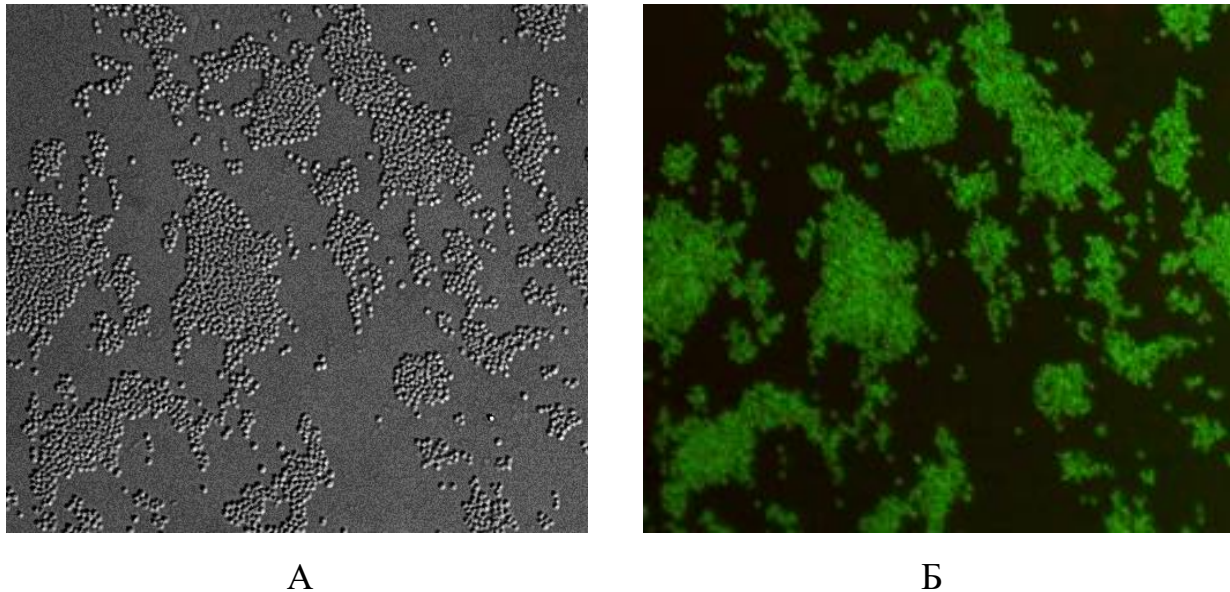
№П/П	Вид бактерій	Показники оптичної щільності, од. (M $\pm$ m)
Монокультура (біоплівкова форма)		
1.	<i>S. aureus</i> (n=15)	1,69 $\pm$ 0,01*
2.	<i>S. epidermidis</i> (n=21)	1,50 $\pm$ 0,007*
Змішана культура		
3.	<i>S. aureus</i> + <i>L. plantarum</i> 8R-A3 (n=3)	1,82 $\pm$ 0,007
4.	<i>S. epidermidis</i> + <i>L. plantarum</i> 8R-A3 (n=3)	1,56 $\pm$ 0,008
Контролі		
5.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (F-49) (біоплівка)	1,72 $\pm$ 0,04
	<i>S. aureus</i> ATCC 12228 (планктонна форма)	0,09 $\pm$ 0,001*
6.	<i>L. plantarum</i> 8R-A3	1,79 $\pm$ 0,04

Примітка. \* -  $p < 0,001$  - статистично достовірна різниця порівняно з показниками *S. aureus* ATCC 12228 (контроль).

Показник щільності планктонної культури *S. aureus* ATCC 12228 становив лише  $0,09 \pm 0,001$  од., що мало достовірну статистичну різницю порівняно з показником оптичної щільності біоплівок, утворених клінічними ізолятами золотистого стафілокока ( $p < 0,001$ ). *L. plantarum* 8R-A3, як

встановлено, формувала біоплівку з високою оптичною щільністю –  $1,79 \pm 0,04$  од. через 48 год.

Для вивчення плівкоутворення як у моно-, так і у змішаній культурі з лактобацилами використано три клінічних штами *S. aureus* з найбільш вираженими плівкоутворюючими властивостями (рис. 5.3).

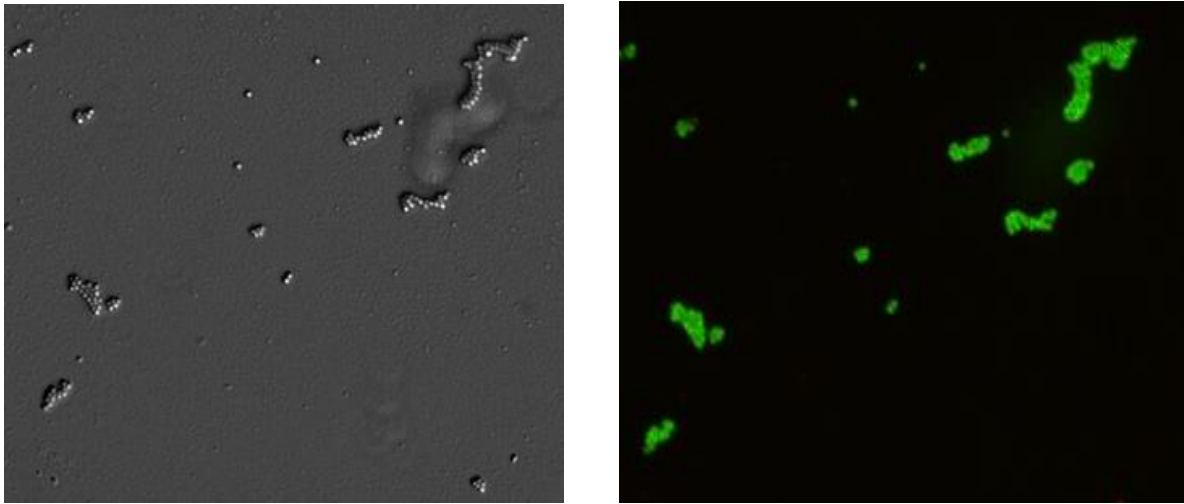


**Рис. 5.3. Біоплівкова форма стафілококу (монокультура):**

**А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням Hoechst-33258 та PI**

При формуванні біоплівок штамами *S. aureus* експозиція складала 24 год, а лактобацил - 48 год, як для моно-, так і для змішаної культури.

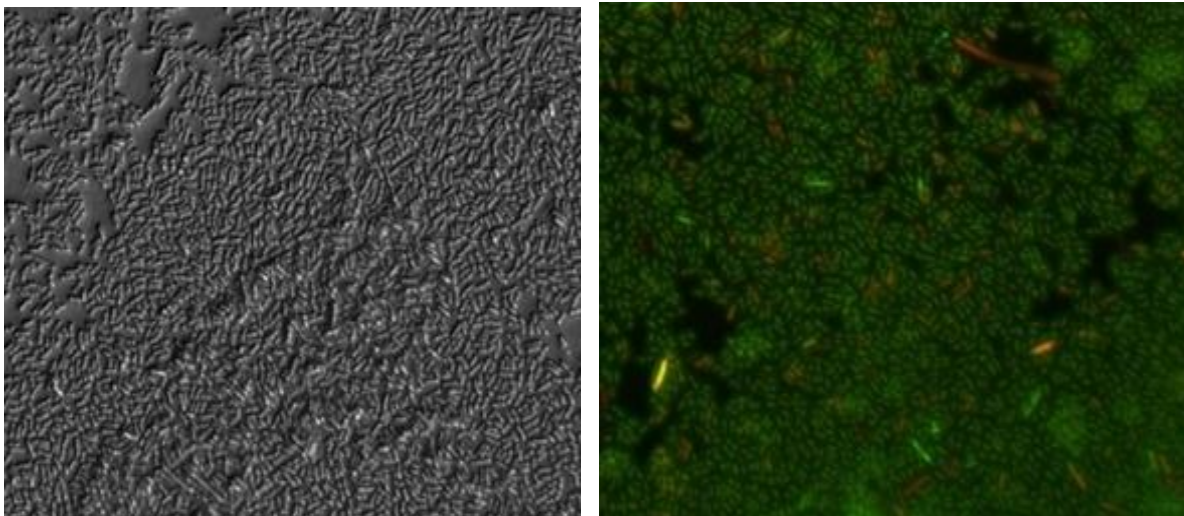
Люмінесцентна мікроскопія підтвердила результати, отримані щодо оптичної щільності біоплівок. Забарвлення Hoechst-33258 та PI дало змогу оцінити життєздатність клітин біоплівкоутворювальної (рис. 5.3, АБ) і планктонної форми *S. aureus* (рис. 5.4, АБ) та біоплівки *L. plantarum* 8R-A3 (рис. 5.5, АБ).



А

Б

**Рис. 5.4. Планктонна форма стафілококу (монокультура):**  
**А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням**  
**Ноеchst-33258 та PI**



А

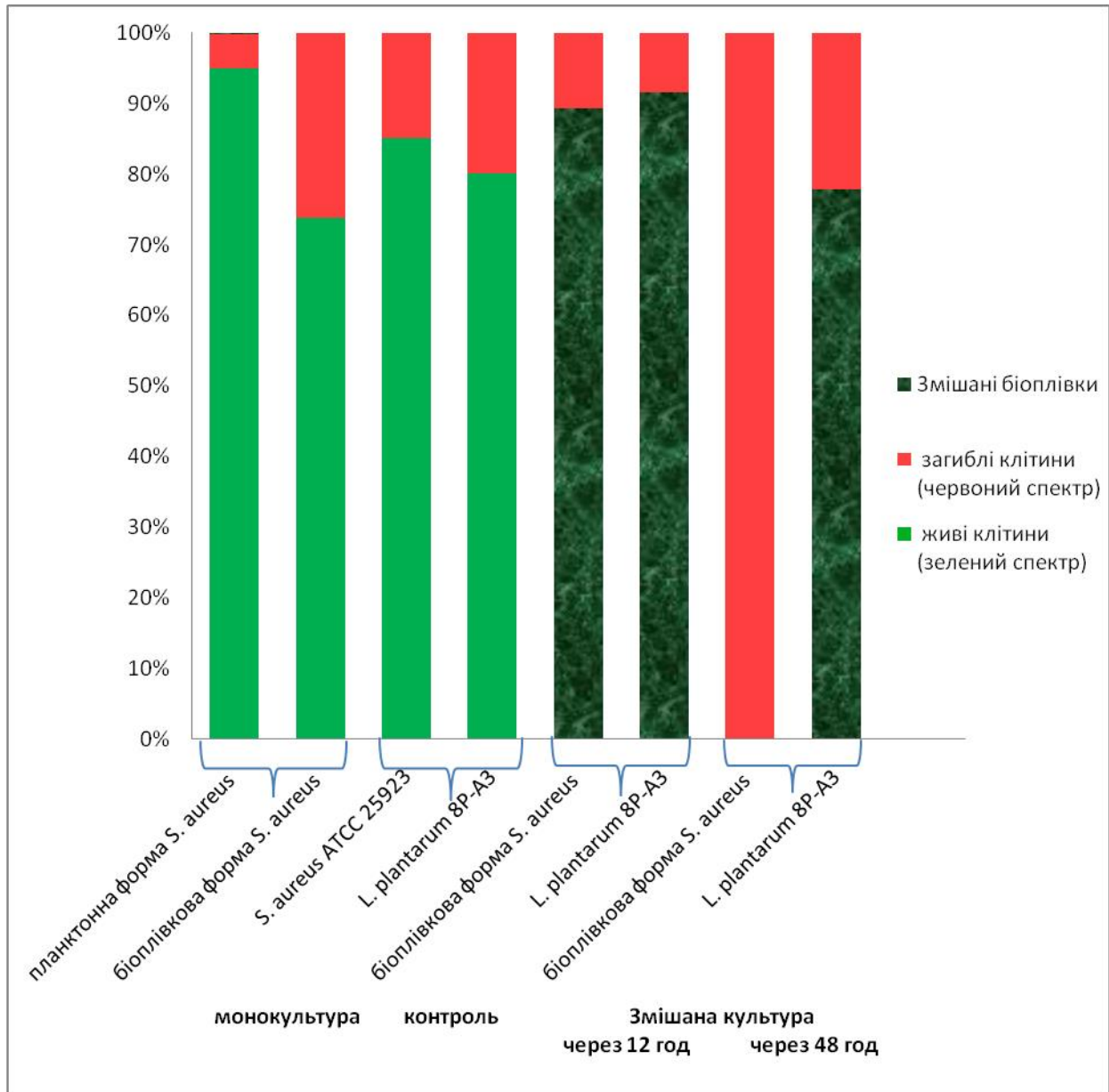
Б

**Рис. 5.5. Біоплівка *L. plantarum* 8R-A3 (монокультура):**  
**А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням**  
**Ноеchst-33258 та PI**

У полі зору 24-годинної монокультури біоплівкоутворювальних стафілококів співвідношення клітин у зеленому/червоному спектрі становить 75

% і 25 %, проте для планктонних стафілококів відповідно – 96 % і 4 % ( $p < 0,001$ ) (рис. 5.6).

Щільність клітин поля зору у зеленому/червоному спектрі для референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) становить відповідно 86 % і 14 %. Щільність біоплівкоутворювальних клінічних та референтного штаму статистично не відрізнялася ( $p > 0,05$ ).

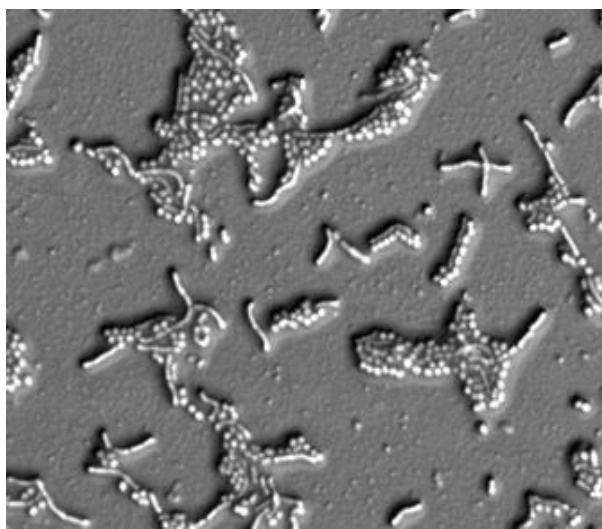


**Рисунок 5.6. Кількість життєздатних і загіблених клітин стафілококів і лактобацил у моно- та змішаній культурах**

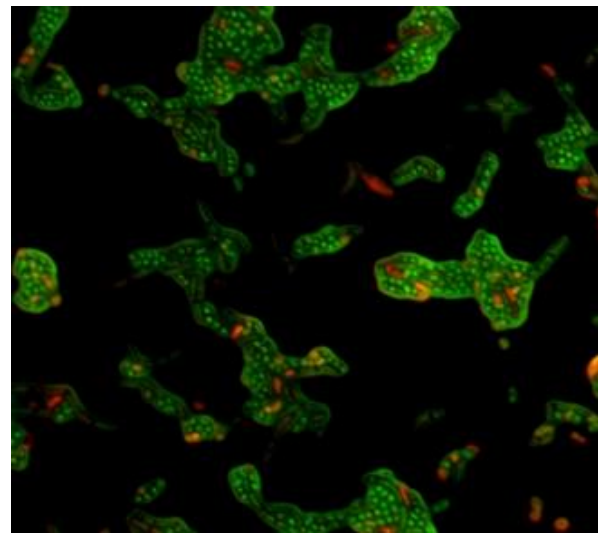


Щільність 48-годинної біоплівки у зеленому/червоному спектрі для *L. plantarum* 8R-A3 була в межах 78 % і 22 %. Аналізуючи щільність біоплівок встановили, що у лактобацил вона в 1,3 рази гущіша за плівку стафілококів ( $p < 0,01$ ).

Проте різниця чисельності клітин у процентному співвідношенні в зеленому/червоному спектрі стафілококів і лактобацил у змішаній культурі через 12 год була незначною: стафілококів 89,2% /10,8% та лактобацил 92,9 %/7,1 % (рис. 5.6, 5.7, АБ).



А

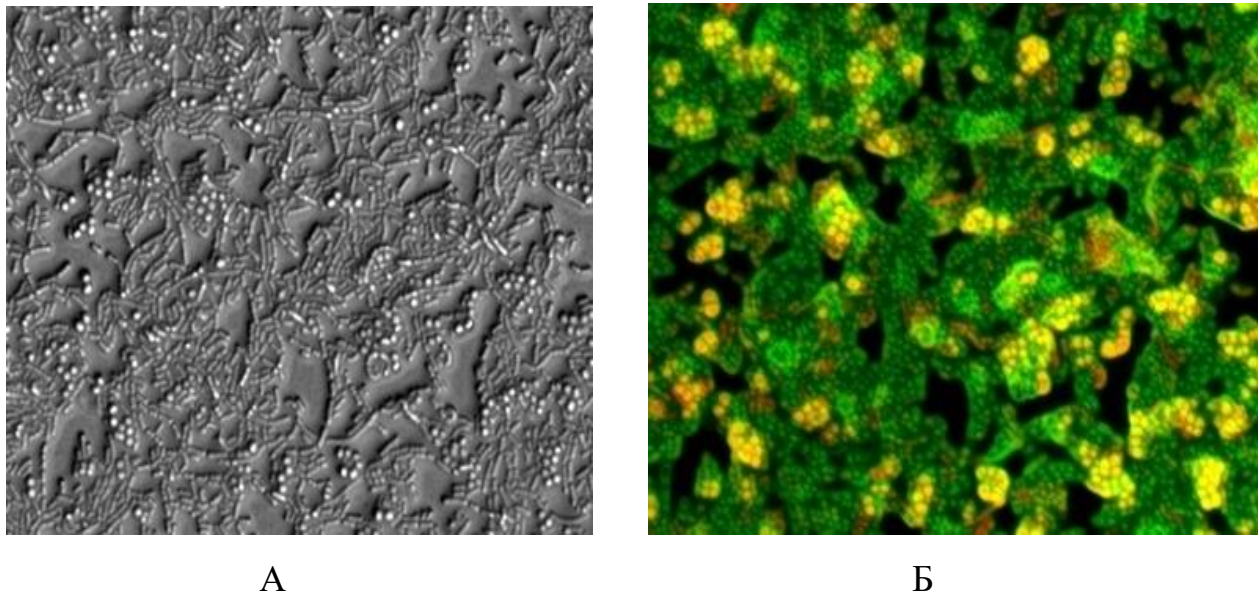


Б

**Рис. 5.7. Біоплівка змішаної культури *L. plantarum* 8R-A3 та *S. aureus* через 12 год: А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням Hoechst-33258 та PI**

Під час формування бівидової біоплівки через 48 год встановлено зростання її щільності, найвищий показник ( $1,82 \pm 0,82$  од.) зафіксований у змішаній культурі *S. aureus* + *L. plantarum* 8R-A3, що підтверджено і в ході мікроскопічного дослідження (рис. 5.8, АБ). При цьому спостерігалась суттєва різниця у співвідношенні стафілококів в зеленому/червоному спектрі, зафіксовано 100% стафілококів лише у червоному спектрі (рис. 5.6).

Отже, рис. 5.8, на якому представлена змішана біоплівка, демонструє флуоресценцію мікроколоній стафілококів лише в червоній ділянці спектру, що свідчить про повну загибель клітин, оскільки при забарвленні PI зв'язується з ДНК і проникає виключно у неживі клітини. Проте життєздатність біоплівки лактобацил збережена і кількість клітин у зеленій/червоній ділянці спектру складає 77,8% / 22,2%.



**Рис. 5.8.** Біоплівка змішаної культури *L. plantarum* 8R-A3 та *S.aureus* через 48 год: А - DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з забарвленням Hoechst-33258 та PI

Люмінесцентна мікроскопія підтвердила результати культурального методу щодо життєздатності клітин стафілококів та молочнокислих бактерій.

Контрольний посів на щільне середовище одразу ж після інокуляції у всіх зразках змішаних культур продемонстрував наявність лише стафілококів ( $5,0 \pm 0,02 \times 10^8$  КУО/мл). У досліді через 12 год зафіксовано випередження формування біоплівкової структури стафілококом через його більш високу швидкість росту порівняно з лактобацилами, відтак популяційний рівень лактобацил сягнув  $10^4$  КУО/мл при збільшенні кількості стафілококів до  $5,0 \pm 0,05 \times 10^9$  КУО/мл. У процесі мікроскопічного дослідження теж встановлено,

що переважна більшість стафілококів зберегла життєздатність (рис. 5.7, Б). Через 24 год кількість життєздатних стафілококів стрімко зменшилася до  $0,5 \pm 0,02 \times 10^8$  КУО/мл, а лактобацил – зросла. Через 48 год після посіву на середовища з усіх зразків стафілококів виділено не було. Отже, молочнокислі бактерії сприяли швидкій загибелі стафілококів у змішаній культурі.

Отже, місцеве застосування препаратів, що містять лактобацили, може підсилювати ефект протимікробної хіміотерапії під час лікування патологічних процесів, спричинених біоплівкоутворювальними формами мікроорганізмів. Завдяки цьому знижується медикаментозне навантаження на організм.

### **5.3. Вплив лактобацил на ультраструктуру біоплівкоутворювальних стафілококів (за даними електронно-мікроскопічного дослідження)**

Метою даного дослідження є вивчення зміни морфологічних структур клінічних штамів стафілококів при формуванні біоплівки у змішаній культурі з клінічними і пробіотичними штамами лактобацил [254-256].

Для дослідження відібрано 5 біоплівкоутворювальних клінічних штамів *S. aureus*, виділених з поверхні шкіри хворих ( $n = 24$ ) *acne vulgaris*, питома вага біоплівкоутворювальних форм склала 20,8%. З слизової верхніх дихальних шляхів здорових пацієнтів ізольовані штами *L. fermentum* ( $n = 4$ ). Як контроль використовували живу культуру *L. plantarum* 8R-A3, що входить до складу пробіотичного препарату «Лактобактерин», яку отримували шляхом культивування в мікроаерофільних умовах спочатку в тіогліколевому середовищі, а потім на MRS-агарі. тандартний біоплівкоутворювальний штам *S. aureus* ATCC 25923 і *S. aureus* ATCC 12228, що не утворює плівку, використовували для визначення контрольного показника. Для визначення кількості життєздатних клітин як стафілококів, так і лактобацил в змішаних культурах біоплівок здійснювали посіви по 10 мкл на щільне середовище відразу після інокуляції через 12, 24, 48 годин. У разі значної щільності отриманої культури перед посівом її розводили, що давало змогу встановити кількість пророслих колоній. Проведено порівняння життєздатності бактеріальних клітин

при висіванні їх із змішаних культур в живильному середовищі за умов моделювання біоплівкової структури.

Контрольний посів на щільне середовище відразу ж після інокуляції у всіх зразках змішаних культур продемонстрував наявність стафілококів в кількості близькій до дози, яка вносилася - від  $(4,5 \pm 0,02)$  до  $(4,8 \pm 0,04) \times 10^8$  КУО / мл, ріст лактобацил відсутній (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

**Динаміка зміни чисельності мікроорганізмів (КУО/мл) при висіванні із біоплівки змішаних культур**

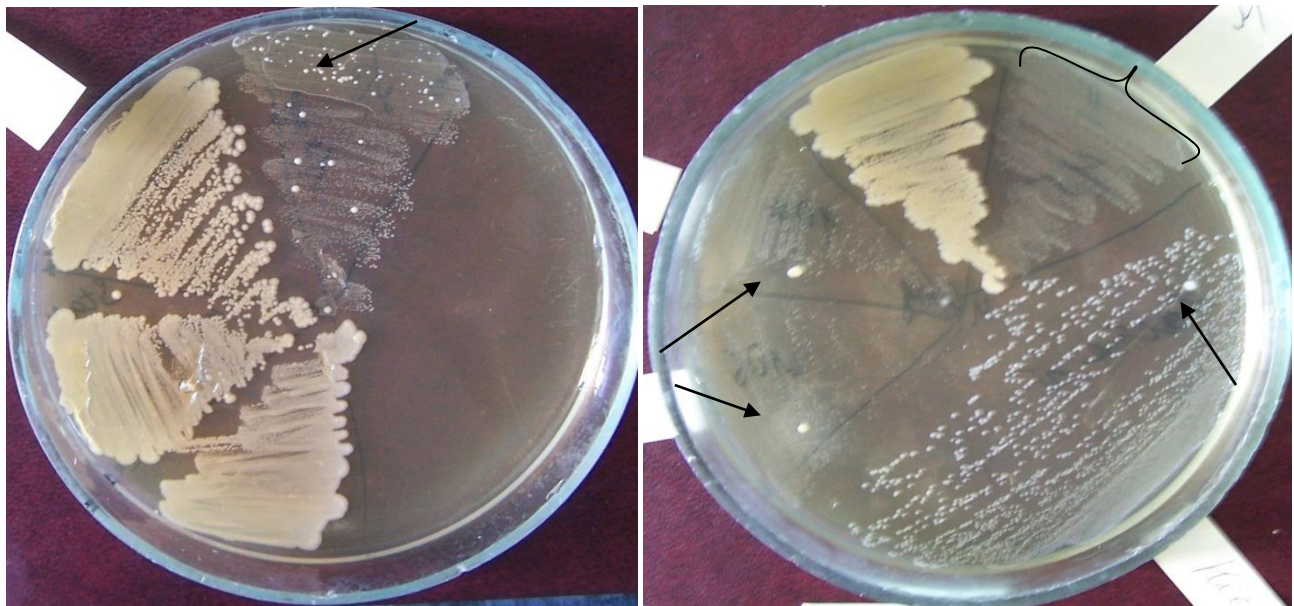
Бактеріальні штами-асоціанти	Кількість мікроорганізмів, КУО / мл				
	Інокуюча доза	0 год	Термін інкубації		
			12 год	24 год	48 год
<i>L. plantarum</i> 8R-A3 і <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (біоплівкоутв. форма)	$10^9$ (1:1)	0* $(4,7 \pm 0,02) \times 10^8$ *	$(1,1 \pm 0,09) \times 10^4$ $(1,2 \pm 0,01) \times 10^6$	$(3,0 \pm 0,82) \times 10^7$ $(1,4 \pm 0,09) \times 10^2$	$(0,9 \pm 0,08) \times 10^{12}$ * 0*
<i>L. plantarum</i> 8R-A3 і <i>S. aureus</i> ATCC 12228 (планктонна форма)	$10^9$ (1:1)	0* $(4,8 \pm 0,02) \times 10^8$ *	$(1,3 \pm 0,08) \times 10^4$ $(2,0 \pm 0,02) \times 10^6$	$(1,0 \pm 0,02) \times 10^8$ $(7,5 \pm 0,56) \times 10$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{12}$ * 0*
<i>L. fermentum</i> , n = 4 і <i>S. aureus</i> (біоплівкоутв. форма), n = 5	$10^9$ (1:1)	0* $(4,6 \pm 0,02) \times 10^8$ *	$(1,5 \pm 0,08) \times 10^4$ $(8,7 \pm 0,07) \times 10^6$	$(1,0 \pm 0,01) \times 10^7$ $(2,3 \pm 0,02) \times 10^3$	$(0,9 \pm 0,09) \times 10^{12}$ * $(1,8 \pm 0,2) \times 10^2$ *
<i>L. fermentum</i> , n = 4 і <i>S. aureus</i> ATCC 12228	$10^9$ (1:1)	0* $(4,5 \pm 0,02) \times 10^8$ *	$(3,1 \pm 0,04) \times 10^4$ $(1,2 \pm 0,04) \times 10^6$	$(1,5 \pm 0,02) \times 10^7$ $(2,0 \pm 0,10) \times 10^3$	$(1,0 \pm 0,08) \times 10^{12}$ * 0*

Примітка. \* - статистично достовірна різниця в порівнянні з показниками контрольних штамів ( $P < 0,05$ ).

Щодо індигенних штамів лактобацил і стафілококів в складі біоплівки, то кількість *L. fermentum* була  $(1,5 \pm 0,08) \times 10^4$  практично такою ж, як пробіотичних штамів, проте рівень біоплівкових стафілококів залишався досить високим  $(8,7 \pm 0,07) \times 10^6$  КУО/мл. Слід відзначити, що при сумісному культивування

*L. fermentum* і планктонної форми *S. aureus* ATCC 12228 рівень лактобацил був найвищим і складав  $(3,1 \pm 0,04) \times 10^4$  КУО/мл.

Через 24 години кількість життєздатних клінічних та референтних штамів стафілококів стрімко зменшилася до  $(2,0 \pm 0,10) \times 10^3$  та  $(2,3 \pm 0,02) \times 10^3$  КУО/мл, а лактобацил - зросла до  $10^{7,8}$ . Після експозиції 24 години кількість *L. fermentum* була дещо нижчою в порівнянні з активністю пробіотичної лактобацили. Спостерігалось пригнічення росту референтних стафілоків до  $(1,4 \pm 0,09) \times 10^2$  (біоплівкова форма) і ще більшою мірою - планктонного стандартного штаму стафілококу -  $(7,5 \pm 0,56) \times 10$  КУО/мл. Через 48 годин після посіву на середовище з усіх зразків були ізольовані лактобацили, кількісний рівень яких досяг  $10^{12}$ . Виділення стафілококів припинилося у змішаній культурі з *L. plantarum* 8R-A3, за винятком випадку індигенних штамів *L. fermentum* і *S. aureus* (біоплівкова форма), де отримано ріст окремих колоній стафілококів у кількості  $(1,8 \pm 0,2) \times 10^2$  КУО/мл ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.9).



А

Б

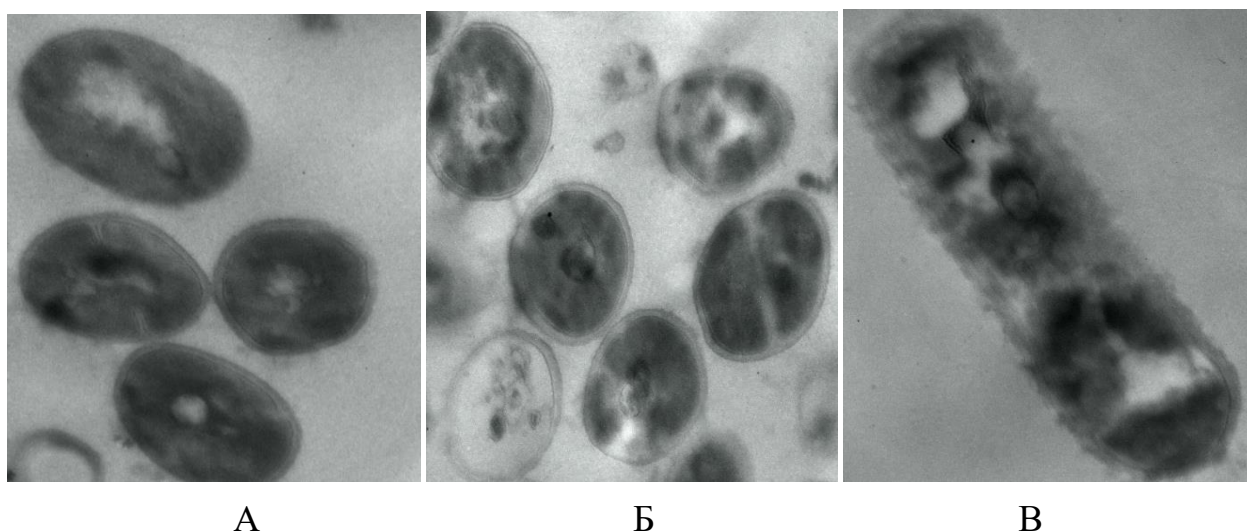
**Рис. 5.9. Ріст стафілококів та лактобацил при висіванні із структурованої біоплівки після закінчення: А – через 24 год; Б – через 48 год (ріст окремих колоній стафілококів вказаний стрілками, фігурною дужкою позначений сектор росту штаму *L. plantarum* 8R-A3 )**

Підрахунок чисельності бактерій у складі біоплівки через певні часові проміжки інкубації, проводили за допомогою висівання на середовище MRS-агар лактобацил, і на глюкозний агар стафілококів. Проте, потрібно зазначити, що культивування посівів на глюкозному агарі проводили за аеробних умов, за яких росту лактобацил не очікувалось, а прогнозувалося виявлення чисельності стафілококів.

Таким чином, нами вперше отримано ріст лактобацил на глюкозному агарі (1%) в аеробних умовах, але за умов їхнього спільного культивування з біоплівкоутворювальними стафілококами у складі біоплівки.

Для оцінки характеру пошкодження клітин стафілокока в змішаній культурі з лактобацилами було проведено вивчення ультраструктури зазначених видів бактерій в умовах моделювання біоплівки. Аналіз електроннограм в контрольних зразках 24-годинних монокультур плівкоутворювальних і планктонних стафілококів і 48-годинних культур лактобацил дав змогу зафіксувати закономірний розвиток популяції на клітинному рівні (рис. 5.10). Клітини візуалізуються на різних стадіях морфогенезу: поділ з утворенням цитоплазматичної перегородки, в стані спокою, а також з частковим і повним автолізом (рис. 5.10, Б).

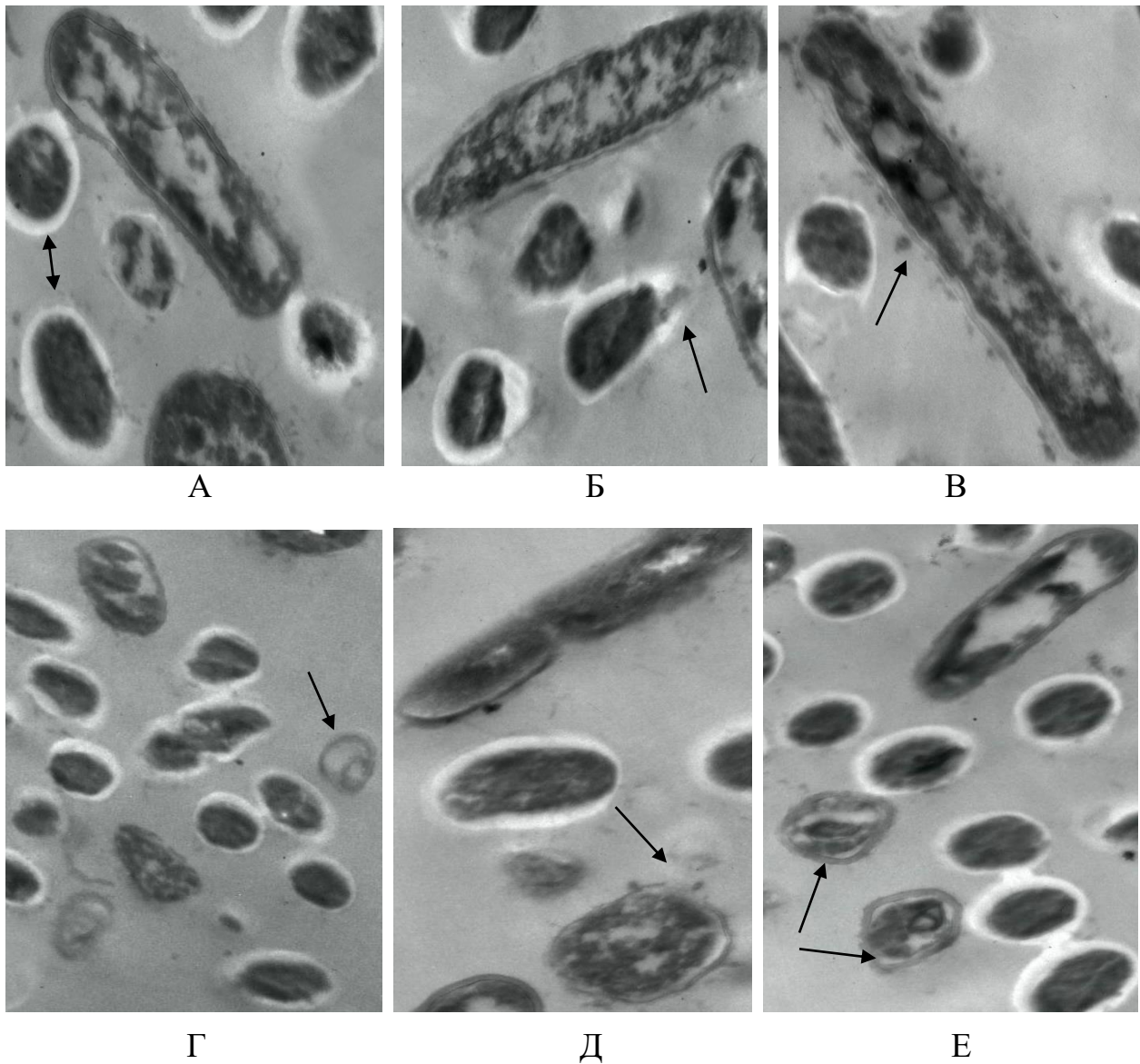
У більшості клітин спостерігалась характерна ультраструктурна організація: товстий пептидоглікановий шар, цитоплазматична мембрана, нуклеоїд дифузно розташований у вигляді світлих фібрилярно-ниткоподібних структур ДНК, мезосома (везикулярні та ламелярні мембранні структури) у місці утворення перегородки. Майже на усіх ультратонких зрізах клітин лактобацил видно поверхневий S-шар, тільки у змішаній культурі із стафілококками він виражений значно більше (рис. 5.11, В). У стафілококів S-шар найкраще проявлявся у монокультурі (рис. 5.10, А).



**Рис. 5.10.** Мікрофотографії (ТЕМ) монокультур стафілококів і лактобацил:  
**А** - планктонна форма *S. aureus* ATCC 12228 (збільшення  $\times 15\ 000$ ); **Б** -  
 біоплівкова форма *S. aureus* ATCC 25923 на різних стадіях розвитку клітин  
 (збільшення  $\times 15\ 000$ ); **В** - клінічний штамп *L. fermentum* (збільшення  $\times 30\ 000$ )

Співставляючи електронограми монокультур стафілококів та змішаних з лактобацилами у складі біоплівок були виявлені значні деструкційні зміни в ультраструктурі клітин стафілококів (рис. 5.11, 5.12).

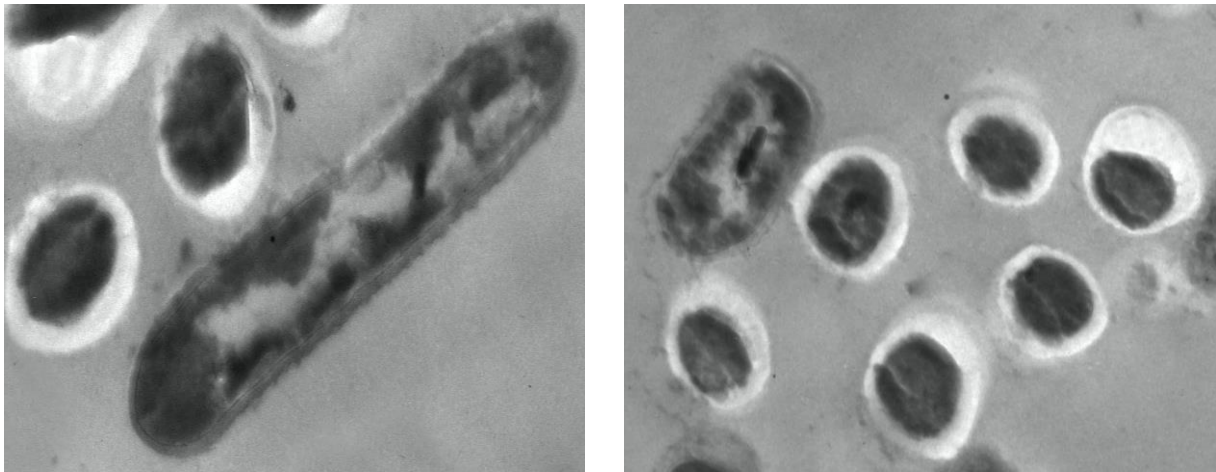
Дестабілізація клітинної стінки виявлялась у її потовщенні, у набутті коками неправильної форми, відшаруванні цитоплазматичної мембрани від клітинної стінки (рис. 5.11, Е) та у повному руйнуванні пептидогліканового шару (рис. 5.11, А), яке спостерігається на усіх електрограмах (рис. 5.11, А-Е). Також зафіксовано розриви клітинної стінки з відтоком клітинного вмісту (рис. 5.11, Б, Д), що призводить до повної втрати цитоплазми і відповідних протоплазматичних структур та появою «клітин-тіней» (рис. 5.11, Г). За рахунок високої електронної густини цитоплазми у зоні нуклеоїда не прослідковується характерної явно вираженої фібрилярно-ниткоподібної структури ДНК, на деяких електронограмах слабо контрастуються мезосомоподібні утворення.



**Рис. 5.11. Мікрофотографії (ТЕМ) змішаних культур стафілококів і лактобацил: (А) *L. fermentum* і плівкоутворююча форма *S. aureus* (збільшення  $\times 15\,000$ ); (Б) *L. fermentum* і *S. aureus* ATCC 12228 (збільшення  $\times 19\,000$ ); (В) *L. fermentum* – надлишок S-шару (збільшення  $\times 22,000$ ); (Г, Д, Е) *L. fermentum* плівкоутворююча форма *S. aureus* (збільшення  $\times 6000$ ,  $15\,000$ ) (стрілками вказано ультраструктурні зміни клітин стафілококів)**

Усі вище згадані деструкційні зміни виявлялись у всіх ультратонких зрізах клітин плівкоутворюючих та планктонних стафілококів під впливом як пробіотичних (рис. 5.12, А, Б), так і індигенних штамів лактобацил (рис. 5.11, А-Е).





А

Б

**Рис. 5.12. Мікрофотографії (ТЕМ) змішаних культур стафілококів і пробіотичних лактобацил: (А) *L. plantarum* 8R-A3 і плівкоутворююча форма *S. aureus* (збільшення  $\times 15\ 000$ ); (Б) *L. plantarum* 8R-A3 і *S. aureus* ATCC 12228 (збільшення  $\times 11\ 000$ )**

Таким чином, при сумісному культивуванні стафілококів і лактобацил встановлено значні структурно-морфологічні зміни у стафілококів як біоплівкоутворювальної форми, так і планктонної. Більшою мірою ці зміни пов'язані із впливом метаболітів лактобацил на клітинну стінку стафілококів.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [254-256].

## РОЗДІЛ 6. Антимікробна активність лактобацил відносно біоплівкоутворювальних стафілококів *in vitro*, виділених від хворих на *acne vulgaris*.

Стафілококи залишаються одними з основних чинників гнійно-запальних захворювань, значна частина яких є саме біоплівкоутворювальними формами.

Утворення біоплівки *S. aureus* найчастіше пов'язано з наявністю екзополісахаридного міжклітинного адгезину PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), молекули якого відповідають за агрегацію клітин і плівкоутворення. Біосинтез PIA здійснюється за допомогою білків, кодованих ВСА оперона (*icaADBC*) [257].

Оскільки PIA вважають основним екзополісахаридним компонентом стафілококового біоплівкового матриксу, нашою метою на першому етапі цього дослідження було виявлення наявності генів *icaA* та *icaD* у клінічних біоплівкоутворювальних ізолятів *S. aureus*.

Для дослідження відібрано 27 штамів *S. aureus*, які за результатами попередніх експериментів здатні формувати біоплівку. Присутність генів *icaA* та *icaD* визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Для виявлення генів використовували праймери [228]:

*icaA* (1315 bp) F: 5'-CCTAАСТААСGAAAGGTAG-3'

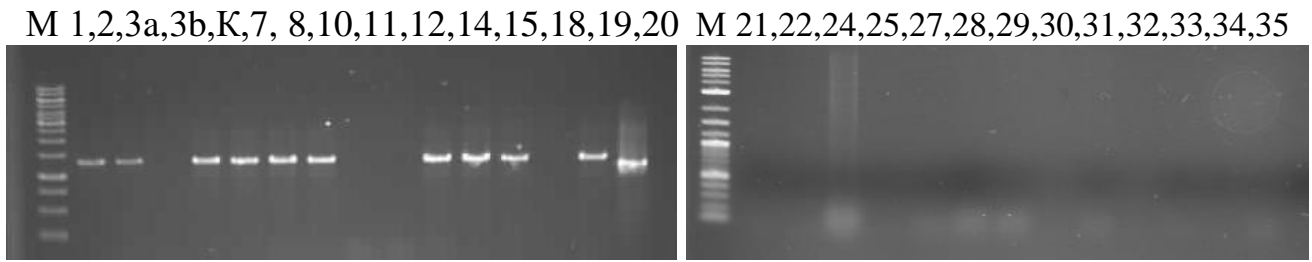
R: 5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3'

*ica D* (381 bp) F: 5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3'

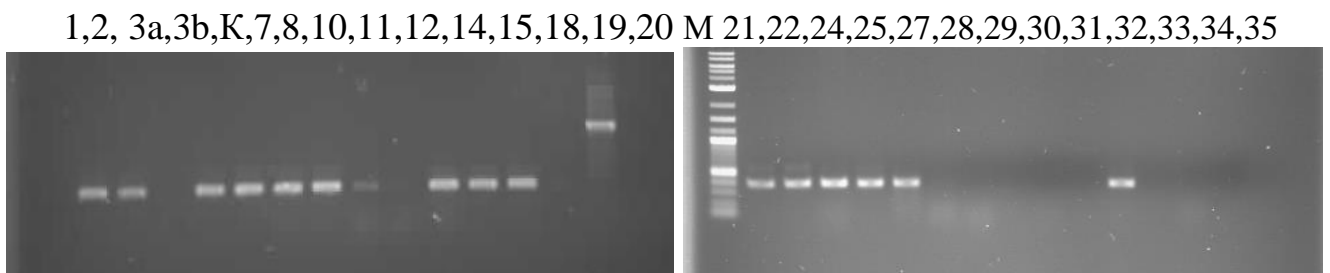
R: 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'

Для контролю визначення біоплівкоутворення використовували стандартну культуру *S. aureus* ATCC 25923.

Ген *icaA* виявлено у 10 штамів *S. aureus* (1, 2, 3b, 7, 8, 12, 14, 15, 19, 20), що становить 35,71 % (10/28), проте, ген *ica D* зустрічався у 15 штамів *S. aureus* (1, 2, 3b, 7, 8, 12, 14, 15, 21, 22, 24, 25, 27, 33) – 53,57 % (15/28) (рис. 6.1, 6.2).



**Рис. 6.1.** Електрофореграми продуктів ампліфікації з праймерами до гену *icaA*: М – маркер молекулярної маси, К – позитивний контроль (ДНК штаму *S. aureus* ATCC 25923), 1-35 - ДНК досліджуваних ізолятів *S. aureus*



**Рис. 6.2.** Електрофореграми продуктів ампліфікації з праймерами до гену *icaD*: М – маркер молекулярної маси, К – позитивний контроль (ДНК штаму *S. aureus* ATCC 25923), 1-35 - ДНК досліджуваних ізолятів *S. aureus*

Для проведення наступного етапу дослідження, було відібрано 15 ізолятів *S. aureus*, потенційних носіїв генів *ica* локуса, які використовували як тест-культури при вивченні антимікробної активності лактобацил.

Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій зумовлені продукцією органічних кислот, перекису водню, антимікробних пептидів та ін. Потужним фактором протимікробної активності лактобацил є продукція бактеріоцинів [258].

Пошук і застосування засобів, які б руйнували біоплівку бактерій є актуальним питанням у підвищенні протимікробної терапії захворювань, спричинених стафілококами.

Мета дослідження – пошук факторів антимікробної активності ізолятів лактобацил відносно біоплівкоутворювальних стафілококів *in vitro*, виділених від хворих на *acne vulgaris* [259].

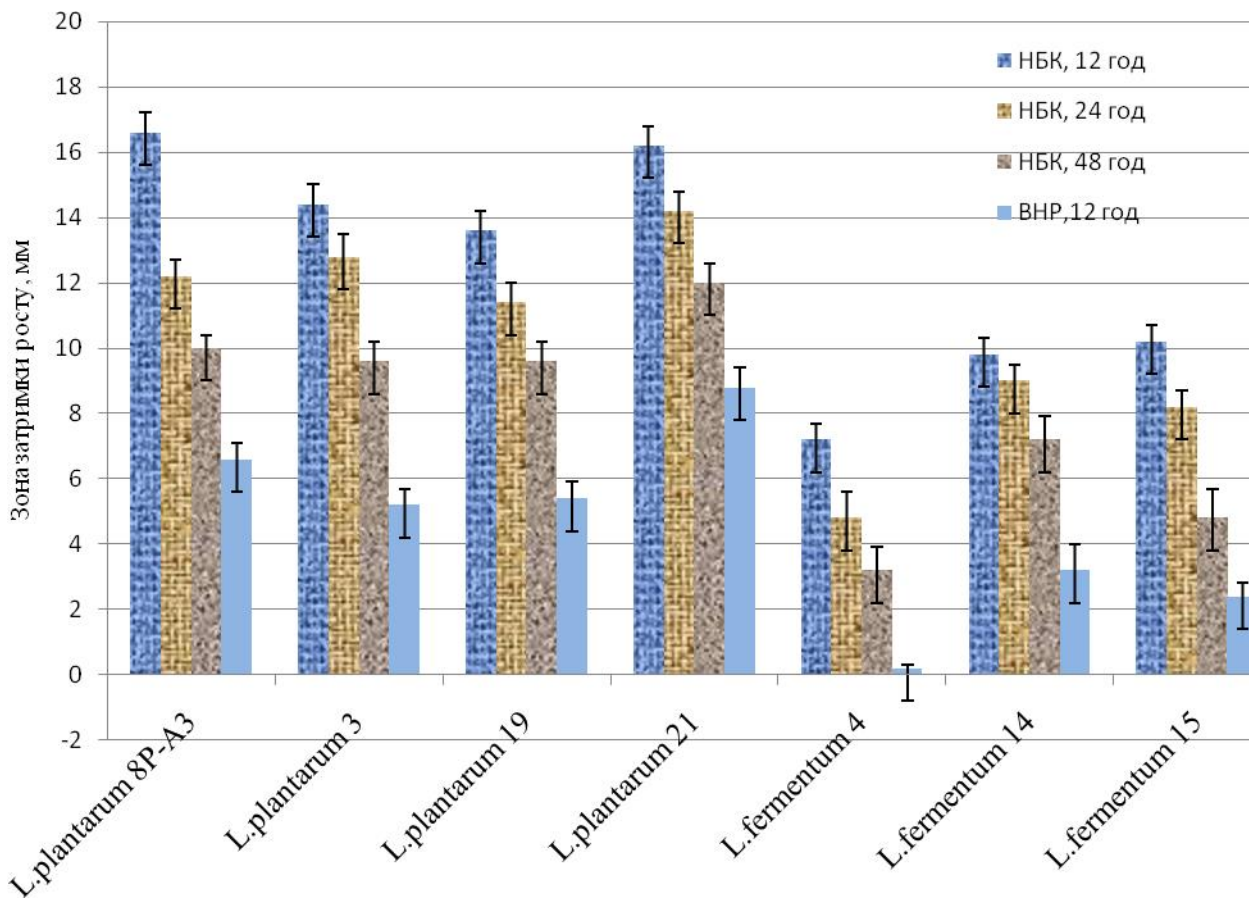
Важливим питанням даного дослідження було також визначення оптимального періоду росту культури для реалізації нею антагоністичної активності.

Об'єктами дослідження були 15 біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus*, ізольованих з гнійних пустул хворих на *acne vulgaris*, та 7 штамів лактобацил. Культури лактобацил ізольовано з пробіотичного препарату, випорожнень кишечника і слизу ротоглотки. Ізоляти *L. fermentum* (n=3) одержано з ротоглоткового слизу, *L. plantarum* (n=3) – з випорожнень практично здорових осіб, пробіотичний штам *L. plantarum* 8R-A3 ізольовано з препарату «Лактобактерин» (Біофарма, Київ).

Антибактеріальну активність досліджуваних штамів лактобацил вивчали щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* через 12, 24, 48 год культивування за допомогою методу дифузії в агар метаболітів нативних бактеріальних культур лактобацил (НБК), їхніх відфільтрованих надосадових рідин лактобацил (ВНР) та нейтралізований супернатант (НС).

Практично усі 12-годинні нативні культури лактобацил продемонстрували високі зони пригнічення росту стафілококів, проте найбільшу зону інгібування зафіксовано за дії пробіотичного штаму *L. plantarum* 8R-A3 -  $16,6 \pm 0,6$  мм, середню активність проявив штам *L. fermentum* 14 -  $7,2 \pm 0,5$  мм. Через 24 год спостерігалася тенденція до зниження активності лактобацил ( $p < 0,001$ ), через 48 год відстежується значне зменшення зон затримки росту стафілококів у порівнянні з середніми показниками активності 12-ти годинних культур -  $7,9 \pm 0,2$  мм проти  $12,5 \pm 0,7$  мм відповідно ( $p < 0,001$ ) (рис. 6.3).

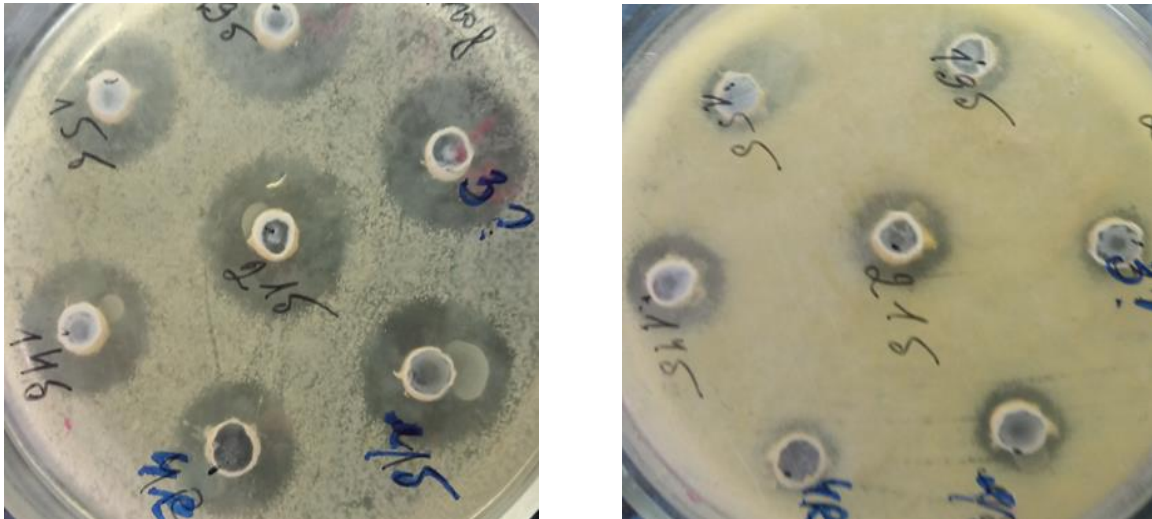
Потрібно відзначити, що антагоністична активність штамів *L. plantarum* (12 год) в середньому є значно вищою -  $14,6 \pm 0,3$  мм, ніж штамів *L. fermentum* –  $9,1 \pm 0,3$  мм ( $p < 0,001$ ), такий тренд спостерігається і для добових і дводобових культур. Також серед усіх штамів лактобацил можна виділити пробіотичний штам *L. plantarum* 8R-A3 та штам *L. plantarum* 21, які зберегли високу антагоністичну активність через 48 год їх культивування.



**Рис. 6.3. Антимікробна активність нативних культур лактобацил та їх надосадових рідин відносно біоплівкоутворювальних штамів *S.aureus* (n=15) у залежності від часу їх культивування - 12, 24, 48 год**

Щодо антибактеріальної дії відфільтрованої надосадової рідини лактобацил (12 год) виявлено різке зменшення їхньої активності у порівнянні з показниками нативних культур лактобацил (12 год)  $12,6 \pm 1,0$  мм проти  $4,5 \pm 0,8$  мм (рис. 6.3, 6.4 А, Б).

Порівнюючи антимікробну активність відфільтрованої надосадової рідини, встановили середню активність штамів *L. plantarum* -  $6,5 \pm 0,8$  мм та низьку для штамів *L. fermentum* -  $1,9 \pm 0,8$  мм ( $p < 0,001$ ).



**Рис. 6.4. Антагонізм досліджуваних штамів лактобацил і пробіотичного штаму відносно біоплівкоутворювального штаму *S. aureus* 3b:**

**А - антагоністична активність нативних 12-годинних культур лактобацил;**

**Б - антагоністична активність надосадових рідин відповідних штамів лактобацил (12 год)**

Проте, отримано протилежні результати відносно антагоністичної активності нейтралізованого супернатанту лактобацил до біоплівкоутворювальних стафілококів. Усі досліджувані ізоляти лактобацил не виявили інгібуючої дії на стафілококи (зона затримки росту=0мм).

Отже, результати антагоністичної активності нативних культур лактобацил є найвищими через 12 годин, фільтрування надосадової рідини лактобацил призвело до різкого зниження їхньої активності, а при нейтралізації цієї рідини ми отримали нульові показники активності.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [259].

## РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Лактобацили виявляються у всіх біотопах травного тракту людського організму та ссавців, починаючи з ротової порожнини і закінчуючи товстою кишкою, є домінуючою мікробіотою вагінального біотопу, що було показано також результатами наших досліджень. Чим різноманітніший видовий склад лактобацилярної мікробіоти, тим ширший спектр фізіологічних функцій вона виконує. Найчастіше з біотопів людини виділяють наступних представників лактобацил: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. helveticus* [260].

Від загальної кількості штамів лактобацил, виділених з біотопу, найбільший відсоток ізолятів отримано з ротоглотки - 81,1 %, 62,5 % - з травного тракту і найменше виділено з урогенітального тракту - 45 %.

Потрібно відмітити, що домінуючим видом у всіх досліджуваних біотопах є *L. acidophilus*, частка якого становить 29,14%. Функціональне значення ацидофільної палички полягає у забезпеченні проліферативних, захисних та регенеруючих процесів (у т. ч. в травному каналі). В усіх біотопах штами *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* виявлялись у різних кількостях. Але штами *L. brevis* висіяно з ротоглотки та випорожнень, а *L. helveticus* і *L. gasseri* - лише з вагінального секрету, *L. salivarius* - з ротоглотки і вагіни.

Особливості видового спектру, очевидно, пов'язаний з характером функцій, притаманних певним видам лактобацил у відповідному біотопі і тканинним тропізмом, який забезпечується специфічними адгезивними структурами.

У всіх екосистемах (ротоглотка, травний тракт, урогенітальний тракт) переважали гетероферментативні лактобацили відповідно 48,9 %, 51,7 %, 52,7 %. Оскільки, мікробіота ротоглотки для своїх метаболічних процесів не має такої різноманітної кількості субстратів, як у травному каналі, доля гомоферментативних лактобацил у ротоглотці (46,5 %) і є вищою у 1,3 рази в порівнянні з травним трактом (38,3 %) та вагіною (33,3 %).

Травна, антагоністична, морфокінетична та інші важливі функції нормобіоти у кишечнику лактобацили виконують у тісній асоціації з іншими бактеріальними симбіонтами. Лише у генітальному тракті жінки функція лактобацил є більш вузькою і більшою мірою потребує взаємодії з макроорганізмом, ніж з іншими мікросимбіонтами.

Вагінальна мікробіота здорових жінок характеризується наступним спектром: лактобацили (45–88 %), стрептококи (53–68 %), ентерококи (27–32 %), епідермальні стафілококи (коагулазонегативні) (34–92 %) [261]. Останні є більшою мірою опортуністи, що не несуть важливого функціонального навантаження.

Найбільш прийнятними представниками нормобіоценозу, які забезпечують оптимальний фізіологічний баланс піхви, є ацидофільні лактобацили, які відіграють захисну роль проти патогенів різними механізмами: продукцією молочної кислоти, що призводить до низьких рН (3,5–4,5), антимікробних сполук, в тому числі бактеріоцинів широкого спектру дії, перекису водню [100], біосурфактантів [262]; посиленням факторів вродженого протимікробного захисту [263]; інгібуванням колонізації патогенів, конкуруванням за сайти адгезії, які використовують урогенітальні патогени, такі як *G. vaginalis*, *N. gonorrhoea*, *C. albicans*, *S. aureus*, види стрептококів групи В, *P. aeruginosa*, *S. agalactiae*, *E. coli* і *P. bivia* [264]. Синтез вагінальними епітеліальними клітинами глікогену за умов нормального функціонального стану статевих залоз, який ферментується лактобацилами з наступним утворенням D- і L-молочної кислоти, також сприяє підтримувannya здорової вагінальної екосистеми [265].

Згідно з нашими дослідженнями з посівів вагінального секрету виділяли як монокультури лактобацил, грибів роду *Candida*, коків, так і їхні асоціації [230].

Лише у 24,38% жінок з піхви виділено лактобацили, що засвідчило стан еубіозу. В інших обстежених пацієнтів лактобацили зустрічались в асоціації з можливими представниками нормофлори, що становить 20,63%. Коки, які



виявлялись у монокультурі на тлі дефіциту лактобацил складали 23,75%, змішаній флорі - 26,25%. У 55% практично здорових жінок з вагінального секрету не виділено лактобацил, що свідчить про поширеність мікробіологічних порушень серед осіб репродуктивного віку. Це підтверджується і даними літератури. Найпоширеніший тип вагінального дисбалансу у жінок репродуктивного віку в усьому світі, що має відношення до 20-25% населення в цілому і до 50% жінок, які звернулись у медичну установу - бактеріальний вагіноз [266]. Високий показник висівання грибів роду *Candida* виявлено у 26,87%, практично здорових жінок, у поєднанні з лактобацилами у 30,23% обстежених.

Подібні результати отримані іншими дослідниками, які повідомляють, що *C. albicans* можуть колонізувати вагінальний тракт близько у 20% жінок з безсимптомним носійством грибів [267].

Дисбіотичні зміни характеризуються не лише альтерацією кількісних показників з боку лактобацил чи появою інших груп мікроорганізмів, але й модифікаційними змінами з боку виявлених лактобацил (зміна морфології клітин, поява атипових колоній при культивуванні), що не може не відбиватись на їхній функціональній активності.

Згідно епідеміологічних досліджень, зростає поширеність опортуністичних інфекцій жіночого уrogenітального тракту, більшість яких пов'язані з ентеробактеріями, бактероїдами, коринебактеріями, кандидами і іншими факультативними і анаеробними бактеріями, що мають потенційну патогенність [268].

Висока частота кандидозних вульвовагінітів разом зі зростаючою проблемою резистентності до лікарських засобів підкреслює необхідність розробки нових ефективних засобів для профілактики і лікування грибкової інфекції [269].

Згідно з результатами останніх досліджень, вплив на процеси переходу стадій «дріжджі-гіфи» *Candida albicans* за допомогою молочнокислих бактерій може стати засобом для лікування кандидозів слизових оболонок та шкірних

покривів і суттєво поглибити розуміння механізмів взаємодії мікроорганізмів під час утворення полівидових біоплівки [270].

За результатами проведених досліджень на виявлення антагоністичної активності, як пробіотичних штамів лактобацил, так і клінічних штамів щодо грибів роду *Candida*, встановлено найбільшу антагоністичну активність пробіотичного штама *L. plantarum* P17630 ( $p < 0,001$ ) відносно *C. albicans*, як практично здорових жінок так і з вульвовагінальним кандидозом, що становило  $37,89 \pm 0,76$  мм та  $34,85 \pm 1,09$  мм, а найменшу активність - *L. acidophilus* KS 400 (відповідно  $14,11 \pm 0,42$  мм та  $15,21 \pm 0,43$  мм). У випадку *L. plantarum* 8R-A3 результати були дещо іншими, оскільки зони інгібування *C. albicans* у практично здорових жінок і з вульвовагінальним кандидозом значно відрізнялися ( $p < 0,001$ ) та становили відповідно  $26,43 \pm 0,53$  мм і  $14,29 \pm 0,42$  мм [232].

Оскільки зросла кількість виявлення видів *C. non-albicans* у виникненні кандидозу [271], досліджено рівень пригнічення *L. plantarum* P17630 росту *C. tropicalis* у практично здорових жінок і з вульвовагінальним кандидозом на  $23,765 \pm 0,63$  мм та  $18 \pm 1,47$  мм, росту *C. glabrata* – на  $16,25 \pm 0,75$  мм та  $13 \pm 1,22$  мм. Проте решта штамів виявили ще нижчу активність: *L. plantarum* 8R-A3 і *L. acidophilus* KS 400 інгібували *C. tropicalis* та *C. glabrata* в межах від  $15,22 \pm 1,22$  мм до  $9 \pm 1,47$  мм і у жінок з вульвовагінальним кандидозом зона інгібування *C. glabrata* штамом *L. plantarum* 8R-A3 відсутня.

Впливу пробіотичних штамів на ріст *C. krusei*, виділених від практично здорових жінок та з вульвовагінальним кандидозом, не зафіксовано. Таким чином, усі досліджувані як пробіотичні штами лактобацил, так і гриби роду *Candida* (окрім *C. krusei*) більшою чи меншою мірою виявляли антагоністичну активність та затримку росту, і вказують, що ці властивості є штамовою ознакою.

Наші результати збігаються з останніми публікаціями, де наведені дані про інгібування росту *C. albicans* та видів *C. non-albicans* (стійких до амфотерицину В, флуконазолу, ітраконазолу) супернатантами *L. plantarum* та

*L. curvatus* [272], в іншому експерименті супернатанти вказаних видів лактобацил здатні до пригнічення утворення біоплівки *Candida spp.* [273], а Kariptaş et al. [274] спостерігали протигрибкову активність кишкових ізолятів *Lactobacillus spp.* проти грибів роду *Candida spp.*, що виділені з гемокультур.

Тим часом, затримка росту *C. albicans* (практично здорових жінок і з вульвовагінальним кандидозом), під дією клінічних ізолятів лактобацил була набагато меншою, ніж від дії комерційних штамів і в середньому становили для *L. plantarum*  $12,04 \pm 0,37$  мм і  $6,64 \pm 0,5$  мм, для *L. acidophilus*  $5,61 \pm 0,3$ - $7,28 \pm 0,3$  мм. Для видів *C. non-albicans* не виявлено інгібування росту грибів клінічними лактобацилами, лише *L. plantarum* затримував ріст *C. tropicalis* на  $7,75 \pm 0,65$  мм.

Відтак, одержані результати свідчать про відсутність антагоністичної активності клінічних ізолятів лактобацил відносно видів *C. non-albicans* та дуже низьку активність відносно *C. albicans* ( $p < 0,001$ ), що сприяє формуванню стійкої асоціації *Lactobacillus spp.* і грибів роду *Candida* у 29,4 % обстежених.

Використання антибактеріальних препаратів для лікування бактеріального вагінозу забезпечує швидкий ефект, але агресивне втручання в мікроекологічну рівновагу в організмі жінки часто призводить до дисбіозу піхви. Така терапія призводить до низьких показників лікування (10-15%) і досить високою частотою рецидивів (до 80%), більше того, повторний вплив антибіотиків збільшує ризик виникнення резистентних штамів, що вірогідно пов'язане з неможливістю організму відновити домінуючу лактобацилярну вагінальну флору. У таких випадках використання пробіотиків, які містять *Lactobacillus spp.* є ефективною стратегією лікування і профілактики [275].

Найвищу антагоністичну активність виявляли усі пробіотичні штами щодо музейних *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51) в межах  $40,25 \pm 1,7$ - $20,5 \pm 0,6$  мм, межі мінімальної активності були відповідно від  $11,25 \pm 0,8$  до  $7,5 \pm 0,6$  мм. Однак, антагоністична активність пробіотиків відносно клінічних ізолятів умовно-патогенних бактерій була дещо нижчою. Межі зон затримки росту *E. coli*, *P. aeruginosa* від  $32,5 \pm 1,04$  мм до  $13,75 \pm 1,1$  мм, а клінічні ізоляти

*S. epidermidis* та *K. pneumoniae* виявили найменшу чутливість до дії пробіотичних штамів відповідно  $3,75 \pm 0,63$  -  $1,0 \pm 0,07$  мм [232].

На основі результатів затримки росту пробіотичними штамми лактобацил референтних штамів та клінічних ізолятів умовно-патогенної мікробіоти виявлено достовірну перевагу в 1,7 разів ( $p < 0,001$ ) щодо останніх, як сумарно, так і окремо кожного пробіотичного штаму.

Якщо порівнювати ефективність досліджуваних пробіотичних штамів стосовно грибів роду *Candida* та інших умовно-патогенних бактерій, слід виділити штам *L. plantarum* 8R-A3, який в дослідженні з грибами виявив найменшу активність, зате відносно бактерій-опортуністів він проявив найвищий результат. Такий результат може бути пов'язаний із лікарською формою пробіотику «Лактобактерин», який застосовують перорально, на відміну решти двох, які випускають у вигляді вагінальних супозиторіїв для інтравагінального введення.

Таким чином, наші результати співпадають з іншими дослідженням, які рекомендують для відновлення мікробіоти піхви та попередження виникнення як бактеріального вагінозу, так і вульвовагінального кандидозу застосовувати вагінальні пробіотичні препарати, що містять лактобацили в поєднанні з антибіотиками, або після їхнього вживання, а також самостійно для попередження рецидивів [275].

Реалізація важливих фізіологічних функцій лактобацил пов'язана з їх адгезивними властивостями. Це дає їм змогу конкурувати з патогенними бактеріями за рецептори, які експресуються на епітеліальних клітинах слизових оболонок, захищаючи їх від пошкоджень, зменшуючи колонізацію патогенів, тим самим запобігають виникнення інфекції, викликаних патогенними бактеріями, і зберігають цілісність бар'єру [141, 144].

Адгезія молочнокислих бактерій – складний процес у якому задіяні як специфічні (ліганд-рецепторні), так і неспецифічні (гідрофобні, електростатичні) взаємодії між мікробними клітинами і епітеліоцитами [276]. Крім цього, прикріплення клітини до поверхні, що зумовлено неспецифічними механізмами

адгезії є початком формування біоплівки бактерій [249]. Останніми десятиліттями вивчаються механізми епітеліально-мікробної взаємодії, які впливають на формування мікробіоценозів і беруть участь у підтримці колонізаційної резистентності [277] та стимуляції здатності до біоплівкоутворення асоціативних мікросимбіонтів [278].

Встановлено, що *L. acidophilus* CRL 1259 і *Lactobacillus paracasei* CRL 1289, виділені з вагінального тракту, інгібували приєднання золотистого стафілокока і стрептококів [279]. Відомо, що багато лактобацил інгібують ріст *Candida spp.* різними способами, такими як конкуренція за місця адгезії або продукуванням різних антагоністичних метаболітів, які перешкоджають їхньому росту і проліферації [280], а також знижують активність процесу плівкоутворення *Candida spp.* від 80 до 58 % [273].

У процесі експерименту високоадгезивними виявились усі «вагінальні» ізоляти лактобацил і в середньому індекс адгезивності складав  $4,19 \pm 0,1$ , а середньоадгезивними - «оральні» та «кишкові» -  $3,76 \pm 0,02$  та  $3,47 \pm 0,03$ . Найвищий показник адгезії для ізолятів з травного тракту встановлено для виду *L. casei* ( $4,66 \pm 0,04$ ), з ротоглотки та вагіни – для ізолятів *L. plantarum* ( $4,1 \pm 0,06$ ,  $4,36 \pm 0,2$ ), що може вказувати на високу спорідненість оболонкових структур, вказаного виду лактобацил до відповідних структур букального епітелію [233-235]. Отримані результати підтверджуються даними літератури, де повідомляється, що різні штами лактобацил володіють специфічною адгезією до певних епітеліоцитів. Так вагінальні штами лактобацил проявляють високий рівень адгезії тільки до вагінального епітелію, а кишкові - до епітелію кишечника [281].

При цьому найважливішу роль у цьому процесі відіграє клітинна стінка лактобацил і згідно джерел літератури у різних видів лактобацил є значні відмінності структури її поверхні [282]. При вивченні адгезивності у клінічних ізолятів лактобацил, виділених з різних біотопів людського організму встановлено більш виражену адгезію досліджуваних штамів до букального епітелію ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з еритроцитами 0 (1) групи крові.

Щодо адгезивності до еритроцитів, то високоадгезивних штамів з досліджуваних біотопів не зафіксовано. Лише середню адгезивність встановлено у *L.casei* кишкового походження і *L.plantarum*, ізольованої з вагіни: ІАМ дорівнював відповідно  $3,0 \pm 0,03$  і  $2,53 \pm 0,08$ . Така суттєва різниця може бути пов'язана завдяки паличкоподібній морфології і розмірам клітин лактобацил, що в свою чергу створюють просторові перешкоди для прикріплення великої кількості бактеріальних клітин до еритроцитів [283].

Відносно коефіцієнту участі бактерій у процесі адгезивності до букального епітелію, потрібно відмітити «ротоглоткові» штами *L. plantarum* та *L. acidophilus*, «кишкові» - *L. acidophilus* та *L. casei*, та «вагінальні» - *L. plantarum* і *L. rhamnosus* у яких він складав від 90 % і більше. Найнижчий відсоток епітеліальних клітин 78 % зафіксовано у кишкового ізолята *L. rhamnosus*.

При оцінюванні здатності прикріплюватися пробіотичних штамів, встановлено менш виражену різницю в кількісних показниках як при використанні клітин букального епітелію, так і еритроцитів. Найбільшу адгезію зафіксовано у *L. reuteri* DSM 179385 до букального епітелію  $5,18 \pm 0,03$  та середню -  $3,02 \pm 0,03$ .

Важливо врахувати той факт, що пробіотик не повинен конкурувати з індигенною мікробіотою, яка завжди є більш фізіологічною для кожного конкретного індивідуума, ніж найцінніші екзогенні бактерії, навіть із найвищим потенціалом корисних властивостей. Активність пробіотика повинна бути спрямована на основну ціль бактеріальної терапії, що полягає у відновленні фізіологічного біоценозу [260].

Основною групою мікроорганізмів, призначених для біокорекції, залишаються лактобацили. Протимікробна терапія із застосуванням хіміотерапевтичних препаратів передбачає для профілактики дисбіозу застосування біопрепаратів, резистентних до відповідних антибіотиків. Крім того, стійкість чи толерантність представників автохтонної мікробіоти різних екологічних ніш людського організму може бути набутою в результаті застосування антибіотикотерапії або застосування біопрепаратів, що містять

мікроорганізми – носіїв мобільних генетичних елементів з детермінантами стійкості. Адже нормальна мікробіота організму є резервуаром лікарської стійкості [284].

Оскільки у дослідженні чутливості лактобацил до антибіотиків, значних відмінностей видової чутливості лактобацил не виявлено, відповідні результати сумовано по екологічних нішах. Таким чином, отримано більш виражену різницю у показниках чутливості до протимікробних препаратів ізолятів із різних мікроекосистем [235].

Порівнюючи процентні показники чутливості ізолятів щодо  $\beta$ -лактамних антибіотиків, потрібно зазначити, що «ротоглоткові» та «вагінальні» ізоляти виявили вищу чутливість до пеніцилінів і цефалоспоринів III покоління (близько 80 % штамів) на відміну від «кишкових» ізолятів, окрім цефалексину. Проте з усіх досліджуваних біотопів чутливих штамів до цефалоспоринів IV покоління встановлено «ротоглоткових» ізолятів лише 9,5 %, «кишкових» - 10,6 % та «вагінальних» - 10,9 %.

Крім того, згідно отриманих результатів у всіх ізолятів зіву, кишечника і вагіни спостерігалась абсолютна стійкість до оксациліну, що співпадає із результатами досліджень [245, 285], а Cunha і співвавт. [286], припускають, що резистентність до ванкоміцину, ципрофлоксацину, цефтазидиму і оксациліну зумовлена природною стійкістю для роду *Lactobacillus spp.*

Для лактобацил стійкість до аміноглікозидів, хінолонів і глікопептидів може вважатися природною. Але разом з тим, знання про стійкість до антибіотиків лактобацил, є неповними, можливо, через велику кількість видів, що зустрічаються в цій групі [287]. Існують суперечливі дані стосовно чутливості лактобацил до оксациліну, згідно даних літератури у 29 % штамів лактобацил виявлено чутливість [288, 289] Результати наших досліджень засвідчили абсолютну резистентність лактобацил до оксациліну. Досліджені нами культури виділено з різних біотопів (ротоглотки, кишечника, вагіни) людського організму, а дані інших публікацій висвітлюють результати

чутливості лактобацил, отриманих з харчових продуктів, пробіотичних препаратів або інших джерел [235].

Так як лактобацили належать до мікроаерофілів, значної чутливості до аміноглікозидів, транспортування яких у мікробну клітину є киснезалежним, ми не очікували, що і було показано для “ротоглоткових” штамів. Позаяк зафіксовано 100 % резистентність до гентаміцину і канаміцину та 85,7 % і 86,9 % відповідно - до амікацину і стрептоміцину. Щодо вагінальних штамів зареєстровано абсолютну стійкість відносно гентаміцину, стрептоміцину, канаміцину та амікацину. Але серед “кишкових” культур до всіх апробованих аміноглікозидів (стрептоміцин, гентаміцин, амікацин) близько 50 % ізолятів були помірно чутливими. Отримані дані співпадають з даними літератури, згідно яких аміноглікозидна резистентність пояснюється відсутністю цитохром-опосередкованого транспорту електронів в анаеробів, включаючи лактобацили [290].

Не виявлено пригнічуючої дії фторхінолонів, які мають широкий спектр дії на аеробну грамнегативну та грампозитивну флору, відносно лактобацил, ізольованих з вагіни (середній показник помірно чутливих штамів з вагіни становив лише 4,6 %), а також - з кишечника (8,3 %), а “ротоглоткові” ізоляти виявили 100 % стійкість до ципрофлоксацину та 85,5 % до левофлоксацину. Антибіотики з групи інгібіторів ДНК-гірази є особливо важливими для лікування захворювань сечогенітального тракту. Резистентність до них лактобацил є бажаною ознакою, що було показано результатами наших досліджень.

У стоматологічній практиці антибіотиками вибору залишаються тетрацикліни та лінкозаміни. Результати наших досліджень підтверджують доцільність такого вибору, оскільки, кількість резистентних ізолятів із ротоглотки була вищою (біля 60 %), ніж вагінальних штамів (менше 55 %). Проте чутливість вагінальних штамів до лінкозамінів становила в середньому біля 80 %.



Показники чутливості лактобацил до макролідів дещо вирізнялись, і в середньому складали 54 % ізолятів із ротоглотки проти 38,2 % з кишечника. Оцінюючи результати стійкості вагінальних штамів до антибіотиків-інгібіторів синтезу білка, а саме до еритроміцину та азитроміцину, встановлено резистентних штамів відповідно 15,5 % і 21 %, чого не спостерігалось відносно кларитроміцину і рокситроміцину.

Важливими хіміотерапевтичними препаратами для лікування хламідійної інфекції і мікоплазмозів є макроліди чи їхні комбіновані аналоги. З огляду на необхідність збереження еубіозу у вагіні більшою мірою є доцільним застосовувати еритроміцин і азитроміцин, оскільки пригнічення ними лактобацилярної нормофлори коливається у межах 57,4 %-58,1 %, а чутливість до кларитроміцину та рокситроміцину була вищою і становила 76,7 %, та 84,5 % штамів відповідно.

Отже, основними препаратами, які входять у алгоритми лікування запальних процесів урогенітального тракту та ускладнених інфекцій (хламідіями, уреоплазмами, гонококами та іншими умовно-патогенними мікроорганізмами) є макроліди, тетрацикліни, лінкозаміни. У цьому випадку препаратами вибору у комбінованих схемах можуть бути фторхінолони, цефалоспорини IV покоління та аміноглікозиди до яких клінічні ізоляти лактобацил виявили стійкість відповідно 93,5 %, 77,5 % та 96,1 %. Раціонально включати одночасно у схеми лікування пробіотичні ізоляти лактобацил, які теж є стійкими до вище згаданих антибіотиків.

Оскільки клінічні ізоляти *L. rhamnosus* лише 1,9% були чутливими до ванкоміцину, препарати, що містять даний вид лактобацил можуть бути рекомендовані до застосування в лікуванні гінекологічних захворювань, а також інших патологічних станах. Наприклад, ванкоміцин є обов'язковим препаратом вибору при антибіотикоасоційованій діареї, викликаній *Clostridium difficile*, його призначають також за умов емпіричної терапії при катетероасоційованому сепсисі, бактеріальних ендокардитах.

За даними літератури, резистентність до глікопептидів серед лактобацил, вважається природною [291], однак результати інших досліджень є неоднозначними стосовно вакоміцину [292].

Оцінюючи чутливість ізолятів виділених із зіву та кишечника, потрібно вказати тенденцію чутливості «ротоглоткових» ізолятів до тих препаратів, які найчастіше призначають відносно грампозитивної мікробіоти, а кишкових – грамнегативної.

Оскільки лактобацили виявили виражену резистентність до ванкоміцину, аміноглікозидів, фторхінолонів та слабку чутливість до цефалоспоринів IV покоління, вказані препарати можуть бути рекомендовані для лікування хворих хірургічного профілю, внутрішньолікарняних і аспіраційних пневмоній та інших госпітальних інфекцій, чинниками захворювання яких є асоціації грамнегативних і грампозитивних аеробів.

Отже, отримані результати дають підставу припустити наявність відмінностей у біологічних особливостях, і зокрема, рецепторному апараті лактобацил, висіяних із ротоглотки, кишечника, вагіни, що важливо для розуміння процесів взаємодії молекули хіміотерапевтичного препарату з бактеріальною клітиною.

Крім чутливості до антимікробних препаратів, нами виявлено пригнічуючу дію антимікотиків на лактобацили. Отримані результати співпадають з іншими дослідженнями в яких деякі види лактобацил можуть бути чутливими до антимікотичних препаратів (полієнів та групи азолів) [245, 293]. Нашими дослідженнями було підтверджено, що у 28% штамів *L.plantarum* виявлено чутливість і у 20 % - помірну чутливість до клотримазолу.

Широке використання антибіотиків – основний фактор, що відбивається на мікробіоценозах природних біотопів, в тому числі н мікробіоті піхви. Отримані результати підтверджують при клінічних симптомах кандидозної інфекції важливість проведення мікробіологічного дослідження з визначенням чутливості до дії різних протигрибкових препаратів індигенної вагінальної мікробіоти.

Отже, при проведенні антибактерійної терапії запальних процесів різної локалізації (зів, товста кишка, вагіна) слід брати до уваги вплив лікувальних препаратів на нормальних симбіонтів, частина з яких має аналогічну чутливість.

Окремим питанням є проблема набуття потенційних збудників інфекційних процесів генів резистентності від мікроорганізмів, які входять до складу біопрепаратів [294].

Експериментально було показано, що деякі плазмідні гени, що визначають резистентність до антибіотиків золотистого стафілококу, у складі векторних плазмід виявляють високу трансформаційну активність при електропорації різних штамів *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, що дає змогу віднести сконструйовані структури до репліконів широкого кола господарів [284, 294]. Отже, доведено можливість участі лактобацил у поширенні генів лікарської резистентності, зокрема, можливість передачі R-плазмід від “диких” і пробіотичних культур лактобацил різним видам грампозитивних бактерій як *in vitro*, так і *in vivo* [295, 296].

Визначення чутливості до протимікробних препаратів пробіотичного штаму лактобацил могло би бути доцільним для попередження можливих побічних ефектів. У зв'язку з цим ефективність тестування антимікробної чутливості - необхідний критерій відбору пробіотичних культур, так і для планування ефективної індивідуальної антимікробної терапії [214].

Нині існує безліч препаратів, які негативно впливають на кількісні та якісні характеристики приєпітеліальних біоплівки, зокрема через інгібування найціннішого анаеробного компонента і збільшення умовно-патогенної флори [297]. А штучне заселення біотопів організму інокульованими штамми лактобацил пробіотиків найчастіше носить транзиторний характер [298].

Важливим чинником у відновленні мікробіоти кишечника є біосумісність між індигенними та інокульованими штамми лактобацил. За допомогою змодельованого експериментального дисбактеріозу антибіотиками (ципрофлосацином і лінкоміцином) у лабораторних тварин проаналізовано характер змін складу кишкової мікробіоти, а також проведено оцінку як

самостійного відновлення індигенної мікробіоти, так і за участі пробіотичних штамів лактобацил [247].

Слід зазначити, що відбувалися зміни у поведінці тварин: з'явилась в'ялість, відмова від їжі та спрага. Ці зміни зберігались найдовше як в контролі, так і в тварин, які отримувала власні лактобацили. Зате у тварин, які отримували штами пробіотичних лактобацил та суміш штамів індигенних та інокульованих лактобацил на 5-6-й день спостерігались ознаки нормалізації стану організму і приросту маси тіла.

Наші результати щодо зниження маси мишей під час трьох днів біокорекції збігаються з іншими даними літератури, у яких описують характер взаємовідносин резидентної та пробіотичної флори. Коли культура бактерій у складі пробіотика потрапляє в кишечник, виникає необхідність пристосування до умов нового середовища та субстратів. Під час затримки у lag-фазі інокульованих бактерій на них чиниться тиск антагоністичного впливу резидентної мікробіоти. Відповідно частка мікроорганізмів, що пристосувалась і вижила в даних умовах, зменшується [299].

Потрібно відмітити, що у контрольній групі за відсутності корегуючої терапії, теж відбувався приріст маси тіла особин тварин.

Проблема біонесумісності резидентних і фармакопійних штамів обговорюється деякими авторами. Наприклад, згідно даних Н. А. Глушанової і А. І. Блінова *in vitro*, із 24 вивчених штамів резидентних лактобацил, лише шість виявилися біосумісними із пробіотичним штамом *L. acidophilus* 317/402 та *L. plantarum* 8P-A3. Біонесумісність пробіотичних і резидентних лактобацил проявлялась розвитком реакцій двох типів: «резидентний штам проти пробіотика» та «пробіотик проти резидентного штаму» [28].

Найбільшу швидкість набирання маси тваринами до вихідних значень, ми спостерігали у відновлювальний період (через 13 днів після біокорегуючої терапії) у всіх групах. Причому у групі тварин, яким проводили корекцію пробіотичними штамами, спостерігалось переважання маси в кінці експерименту у порівнянні з вихідними значеннями.

Відношення маси однієї особини у відновлювальний період на 13-й день до маси 4-го дня корекції у контрольній групі зафіксовано зростання у 1,41 рази, як у 2-й та 4-й групах, а у 3-й групі – у 1,39 рази. Отже, у контрольній групі темпи збільшення маси були на рівні інших груп. Це може бути доказом того, що мікробіота кишечника має високий потенціал до самовідновлення в стресових умовах антибіотикоасоційованого дисбактеріозу.

Після триденного доочеревинного введення лінкоміцину та ципрофлоксацину у всіх мишей спостерігалась повна елімінація *E. coli* та *Bifidobacterium spp.* у порівнянні з показниками до початку експерименту ( $5,37 \pm 0,07$  та  $6,32 \pm 0,09$  lg КУО/г відповідно). Встановлено значне зменшення кількості *Lactobacillus spp.* -  $1,67 \pm 0,38$  проти  $7,29 \pm 0,09$  lg КУО/г. Дещо знижена концентрація стафілококів на  $1,1$  lg КУО/г, проте ентерококів стало більше на  $0,59$  lg КУО/г та встановлено проліферацію грибів роду *Candida spp.* до  $2,01 \pm 0,4$  lg КУО/г за відсутності грибів до експерименту.

Згідно з даними літератури, короткочасне застосування антибіотиків може спричинити тривалі наслідки, пов'язані з мікроекологічними змінами кишечника [297].

Після корекції індигенними та пробіотичними лактобацилами (10-ти днів) у тварин дослідних груп встановлено, що імплантація аутоштамів лактобацил мало сприяє відновленню мікробіоти ( $p > 0,05$ ). Однією з причин відсутності ефекту або низької ефективності пробіотиків є їхня чужерідність по відношенню до внутрішнього середовища людського організму [300]. В рамках досліджень з реалізації концепції пробіотикотерапії проводяться роботи на новому рівні, в основі яких лежить використання в якості пробіотиків аутоштамів мікроорганізмів (аутопробіотиків) кишкової мікробіоти [301, 302]. За результатами останніх досліджень можливе набуття чужорідності (гетерологічності) індигенними штамми лактобацил після культивування на штучному поживному середовищі, після чого їх можна вважати біотехнологічними [303]. Отримані нами результати підтверджують набуття вказаних властивостей аутоштамами лактобацил, оскільки показники

фізіологічного стану тварин (маса тіла), кількісні рівні *Lactobacillus spp.* впродовж усього експерименту тварин у контрольній групі та мишей, яким згодовували власні лактобацили після пасажування у лабораторних умовах, достовірно не відрізнялися.

Більшість мікробних спільнот відновлювались до первинного стану через 4 тижні після припинення лікування, але разом з тим деякі види мікроорганізмів не відновлювались навіть через 6 місяців після відміни антибіотика [246].

Є цікавим той факт, що після елімінації пробіотичних лактобацил кількісний рівень *Lactobacillus spp.* та *Bifidobacteriu spp.* у 3-й групі тварин (корекція пробіотичними штамми) і 4-й групі (суміш штамів індигенних та пробіотичних) становить відповідно лише  $4,45 \pm 0,16$  та  $5,17 \pm 0,11$  і  $4,24 \pm 0,1$  та  $5,22 \pm 0,13$  відповідно проти  $7,72 \pm 0,06$  та  $6,36 \pm 0,15$  lg КУО/г ( $p < 0,05$ ) в 1-й (контроль, фізіологічний розчин) і 2-ій (корекція автоштамами) групах.

Відтак, отримані в експерименті на лабораторних тваринах результати можна в подальшому екстраполювати на організм людини як в плані профілактики, так і лікування дисбактеріозів [304].

На сьогодні дослідження мікробного агента як етіологічного фактора в розвитку інфекційних запальних процесів потребує особливих підходів, якщо це стосується біоплівкових форм мікроорганізмів.

Здатність до плівкоутворення є важливою властивістю як для потенційних патогенів (зокрема, золотистого й епідермального стафілококів), так і для нормальних симбіонтів людського організму, що сприяє виживанню їхніх популяцій з різними наслідками для організму людини [252]. Повноцінне виконання функцій лактобацилярної нормофлори можливо лише при збереженні ними біоплівкової структури.

Стафілококи визнані одними з основних чинників інфекцій пов'язаних з біоплівками. Входячи до складу природних біотопів (шкіра, слизові оболонки респіраторного й уrogenітального трактів тощо) [305, 306], вони перебувають у симбіотичних відносинах з іншими мікроорганізмами біотопу. Таким чином,

метаболичні процеси, що відбуваються у біоплівці, відрізняються від процесів у планктонних бактеріальних монокультурах [12, 41].

Дослідження взаємодії стафілококів із бактеріями-антагоністами у формі біоплівкової структури є важливим для обґрунтування та розробки комплексної антимікробної терапії.

Незважаючи на достатньо добре вивчені механізми розвитку вугрової хвороби і розроблені уніфіковані протоколи лікування, не втрачають актуальності питання підвищення ефективності терапії акне, досягнення більш швидкого регресу елементів акне, стійкої і тривалої ремісії, естетичного результату [186].

Відомо, що у таких хворих виявлені глибокі зміни кількісного та якісного складів мікробіоти шкіри, тому варіації бактеріальної колонізації є одним з основних елементів в його розвитку [307].

Пробіотичні препарати, гальмуючи запалення, а також підтримуючи гідратацію шкіри і відновлення бар'єру мають першочергове завдання при лікуванні акне [308]. Тому нами було проведено дослідження по вивченню дії молочнокислих бактерій на плівкоутворюючі стафілококи.

Згідно з результатами останніх досліджень, концентрація стафілококів зростає у процесі наростання клінічних проявів акне [309, 310].

Із гнійних пустул пацієнтів з *acne vulgaris*, ізольовано 36 штамів стафілококів (52,17 %) з них плівкоутворюючих форм: 15 ізолятів *S. aureus* (41,67 %) та 21 – *S. epidermidis* (58,33 %).

Отже, стафілококами з високим потенціалом до плівкоутворення, задіяні у розвитку вугрової хвороби, що сприяє рецидивуванню хвороби і є однією з причин низької ефективності протимікробної терапії. Зокрема, біоплівки високої щільності утворює як культура вірулентна (*S. aureus*), так і умовно-патогенна бактерія (*S. epidermidis*).

За даними Ranі та його колег встановлено, що розмноження *S. epidermidis* в біоплівці складається не менш, ніж з чотирьох метаболичних станів: аеробного росту, анаеробного росту, в стані спокою і мертвих клітин [311]. Припускають,

що вказані фізіологічні стани, виявлені в біоплівці, допускають толерантність до антибіотиків, відтак руйнування конкретної ділянки біоплівки (наприклад, анаеробного стану) може підвищувати ефективність антибіотикотерапії інфекцій, опосередкованих біоплівкою [312].

Прижиттєве подвійне фарбування біоплівок флуоресцентними барвниками Hoechst-33258 та PI, дало змогу оцінити життєздатність мікроорганізмів в середовищі біоплівки моно- та бівидових культур. Вказані барвники зв'язуючись із ДНК живих клітин зумовлювали флуоресценцію в зеленій ділянці спектру, а із ДНК загиблих – в червоній.

Нами зафіксовано підвищення щільності плівки *L. plantarum* 8P-A3 через 48 годин у 1,3 рази у порівнянні з щільністю плівки стафілококів, що може вказувати на фізіологічну властивість у нормосимбіонтів формувати захисні структури і на те, що пробіотичні штами культивувались у звичних для них лабораторних умовах. Проте у процентному співвідношенні кількості клітин у зеленій/червоній ділянці спектру між плівкоутворюючими стафілококами (75/25%) і лактобацилами (78/22%) значної різниці не виявлено.

Співвідношення живих/загиблих клітин у біоплівці монокультур стафілококів (через 24 години) і лактобацил (через 48 годин), так і у змішаних культурах через 12 годин показали практично однакові показники ( $P > 0,05$ ), що може свідчити про єдині механізми формування біоплівок для всіх бактерій.

Однак, вже через 48 годин за умов найвищого рівня щільності змішаної біоплівкової структури зафіксовано повну загибель клітин стафілококів ( $p < 0,001$ ), а саме кількість клітин у зеленій/червоній ділянці спектру складала 0/100%. Втім показники життєздатності біоплівки лактобацил (через 48 год) збережені і не вирізнялись від такої через 12 годин і були на рівні 77,8% .

При моделювання полівидової біоплівки з участю *C. albicans* ATCC 18804 та *Lactobacillus GG* зафіксовано порушення процесів переходу стадій «дріжджі-гіфи» *Candida albicans* під впливом молочнокислих бактерій, які заповнили проміжки між мікроколоніями і псевдогіфами грибів, що може стати засобом для лікування кандидозів слизових оболонок та шкірних покривів та



суттєво поглибити розуміння механізмів взаємодії мікроорганізмів під час утворення полівидових біоплівок [270].

Контрольні посіви з біоплівки на поживне середовище підтвердили результати отримані при люмінесцентній мікроскопії.

Зовнішнє застосування препаратів лактобацил підсилює ефект протимікробної хіміотерапії під час лікування патологічних процесів, спричинених біоплівковими формами мікроорганізмів. Завдяки цьому знижується медикаментозне навантаження на організм [252].

Різні види *Lactobacillus* входять до складу основних природних біосистем організму людини та беруть участь в утворенні полівидових біоплівки, які містять два або більше представників у межах асоціації. Доведено, що *L. reuteri*, на основі якого створено чимало пробіотичних препаратів, може запобігати розмноженню патогенних бактерій та відновлювати природну біоплівку нормосимбіотичної мікробіоти урогенітального тракту жінок [57].

Для виявлення ультраструктурних змін клітин стафілококів за умов сумісного культивування з лактобацилами нами проведено електронномікроскопічне дослідження. Проте, цьому дослідженню передувало вивчення процесу формування змішаних біоплівки лактобацил та стафілококів за фіксації чисельності бактерій у складі біоплівки через певні часові проміжки інкубації. При висіванні на MRS-агар змішаної біоплівкової культури (культивування за мікроаерофільних умов) для вивчення життєздатності лактобацил і на 1 % глюкозний агар (культивування за аеробних умов) для вивчення життєздатності стафілококів на глюкозному агарі нами отримано також і ріст лактобацил (пробіотичних та індигенних ізолятів). Слід зазначити, що використання глюкозного агару за аеробних умов не передбачало виявлення лактобацил, а прогнозувалося зростання чисельності стафілококів.

Таким чином, нами вперше отримано ріст лактобацил на глюкозному агарі в аеробних умовах, але за умов їхнього спільного культивування з біоплівкоутворювальними стафілококами у складі біоплівки.

За результатами електронномікроскопічного встановлено значні деструктивні зміни у структурі клітинної стінки стафілококів через 48 годин культивування бівидової культури (стафілококи+лактобацили). Стафілококи набули неправильної форми, відбулось потовщення клітинної стінки з відшаруванням цитоплазматичної мембрани та повне руйнування пептидогліканового шару [254-256].

У деяких випадках зафіксовано розриви клітинної стінки з відтоком вмісту, що призводить до появи «клітин-тіней». У зоні нуклеоїда не прослідковується характерної явно вираженої фібрилярно-ниткоподібної структури ДНК, на деяких електронограмах слабо контрастуються мезосомоподібні утворення.

Отримані дані узгоджуються з результатами досліджень, проведених різними авторами з вивчення впливу різноманітних чинників (антибіотиків, срібла, холодowego стресу) на ультраструктуру бактерій [313-316], а також із роботами, які показали антиадгезивний, протимікробний і антиплівковий (antibiofilm) вплив біосурфактантів, що продукуються штамми *L. jensenii* і *L. rhamnosus*, до бактерій з клінічною множинною лікарською стійкістю (*Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *S. aureus* (MRSA)), які здатні формувати біоплівки на ранах, медичних імплантатах і промислових поверхнях [317]. За результатами TEM підтверджено пошкодження клітинної стінки і показано появу клітин-тіней [314, 315].

Білки S-шару, утворюючи зовнішню поверхню бактеріальної клітини, у лактобацил задіяні до забезпечення гідрофобності, аутоагрегації і адгезії до різних поверхонь [318], що сприяє інгібуванню патогенів [319]. У наших дослідженнях збільшення S-шару лактобацил більше виявлялось у змішаних культурах із стафілококами на відміну від монокультур лактобацил, що є підтвердженням даних інших джерел [320], у яких повідомляється, що при його видаленні бактерії втрачають здатність до бактеріальної агрегації, яка безпосередньо впливає на комунікативну властивість лактобацил та на їхній пробіотичний ефект.

Активність лактобацил сприяє пригніченню утворення біоплівки і індукує ультраструктурні зміни в клітинах *S. aureus* і *S. epidermidis*, що призводить до їхньої загибелі [5].

Наші дослідження показали, що у разі комбінації біоплівкової форми *S. aureus* і клінічних штамів лактобацил в полі зору зустрічаються клітини стафілококів у стані спокою, і при посіві зберегли свою культурабельність *in vitro*, що вказує на високу конкурентоспроможну здатність стафілококу [256].

Таким чином, клінічні штами лактобацил, пристосовані до умов макроорганізму, активно відтворюються *in vitro*, будучи досить ефективними антагоністами в умовах біоплівки. Проте, у кількісному співвідношенні пробіотичні молочнокислі бактерії сприяють більш швидкій загибелі стафілококів у змішаній культурі.

Наступне наше дослідження полягало у пошуку факторів антимікробної активності ізолятів лактобацил відносно біоплівкоутворювальних стафілококів *in vitro*, виділених від хворих на *acne vulgaris*.

І першим нашим завданням було підтвердити присутність генів біоплівкоутворення за допомогою молекулярно-генетичних методів. Серед 27 ізолятів *S. aureus* нами виявлено наявність генів *icaA* у 35,71 % штамів, а ген *icaD* – 53,57%. Проте цей результат не є свідченням того, що решта штамів не є біоплівкоутворювальними, оскільки, паралельно існують механізми формування біоплівки не пов'язані з опероном *ica*.

Хоча РІА, безумовно, є основним механізмом формування біоплівки у *S. aureus* і *S. epidermidis*, чимало досліджень у вивченні біоплівки засвідчили існування, особливо для *S. aureus*, альтернативних шляхів формування біоплівки, які не залежать від РІА [257].

Антистафілококова активність штамів лактобацил здійснюється продукцією неспецифічних антимікробних метаболітів, а також бактеріоциноподібних інгібуючих субстанцій (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substances), біосурфактантів [5], які забезпечують потужне втручання в біоплівкову спільноту за рахунок зміни поверхневих властивостей бактеріальних

клітин, знижуючи їхню адгезію, перешкоджають розвитку біоплівки і міжклітинної взаємодії [321, 322].

Доведено ефективність використання лактобацил і біфідобактерій при шкірних захворюваннях у вигляді препаратів місцевого застосування [256, 323]. І як було продемонстровано, пробіотичні штами лактобацил можуть пригнічувати прилипання шкірного патогена *S. aureus* до кератиноцитів людини [324] і попереджувати їхнє розмноження.

Тому нами було проведено дослідження з вивчення дії метаболітів молочнокислих бактерій на біоплівкоутворювальні форми стафілококів [259].

Отримані результати продемонстрували значну відмінність у антагоністичній активності нативних культур лактобацил та відфільтрованих надосадових рідин відносно біоплівкоутворювальних стафілококів.

Досліджені ізоляти нативних культур лактобацил через 12 год проявили високу активність, проте в динаміці росту їхня активність зменшувалася у порівнянні з 48-годинними культурами майже у 2 рази. Це підтверджує, що максимальний синтез антимікробних факторів відбувається впродовж активного росту бактерій.

У подібних дослідженнях синтез плантарицину VM-1 (*Lactobacillus plantarum* VM-1) починався швидко на ранній експоненціальній фазі і досягав максимуму на ранній стадії стаціонарної фази (16 годин). Таким чином, продукція плантарицину VM-1 пов'язана з фізіолого-біохімічною активністю, що було продемонстровано для всіх бактеріоцинів молочнокислих бактерій [229, 325].

Показники антагонізму відфільтрованої надосадової рідини *L. plantarum* (через 12 год) були у 3 рази меншими за показники нативних культур, ще більші втрати антагоністичної активності в порівнянні з нативною культурою зафіксовано для ВНР *L. fermentum* (у 4,7 рази).

Антагоністична активність супернатанту лактобацил відносно індикаторних штамів біоплівкових стафілококів зумовлена продукуванням молочної кислоти та перекису водню, оскільки після нейтралізації

відфільтрованого супернатанту 2 н NaOH та каталазою антагоністичної активності досліджуваних штамів виявлено не було.

Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників щодо втрати інгібуючого ефекту після нейтралізації рН, хоча ферментативна і термічна обробка не впливала на пригнічення [326], що свідчить про небілкове походження факторів антагонізму. Бактеріоцинова експресія регулюється як факторами індукції, які виділяє сам штам-продуцент, так і залежить від умов навколишнього середовища, таких як температура і рН [327].

Таким чином, антагоністична дія лактобацил в основному зумовлена активністю нативних культур, які у фазах активного розмноження і росту продукують антимікробні метаболіти, індукторами яких є біоплівкоутворювальні стафілококи. Досліджені штами лактобацил, пристосовані до умов макроорганізму, активно культивуються і є досить ефективними антагоністами в умовах *in vitro*.

За результатами аналізу антагоністичної активності штамів виду *L. fermentum* можна припустити, що характер їхньої антибактеріальної дії здебільшого пов'язаний не з бактеріоцинами, а синтезом інших антимікробних метаболітів. Інші автори теж вказують на те, що бактеріоціногенні штами *L. fermentum* зустрічаються вкрай рідко. Вони були виділені з слини, вагіни жінок і зелених оливков (328] і зустрічаються з низькою частотою.

Дія ізолятів *L. plantarum* відносно стафілококів є більш вираженою, ніж *L. fermentum*, тому перші можуть з більшим успіхом бути запропоновані для розробки комбінованої терапії акне.

Oldak et al. [329] спостерігали зниження антагоністичної активності нейтралізованого бесклітинного супернатанта в середньому в 10 разів після нейтралізації супернатанту та обробки каталазою.

Окрім того, багато дослідників підкреслюють, що здатність синтезувати антимікробні сполуки, тобто бактеріоцини, є специфічною для штаму. У дослідженні Sip et al. [330] тільки 7 з 800 досліджених штамів продемонстрували здатність синтезувати сполуки, що інгібують ріст *L. monocytogenes* в

нейтралізованому супернатанті; в дослідженні Белікової і співавт. [331], ні один з 125 штамів *Lactobacillus* не виявляв антимікробну активність в нейтралізованому супернатанті.

Зовнішнє застосування лактобацил підсилює ефект протимікробної хіміотерапії під час лікування патологічних процесів шкіри [308, 332], завдяки цьому знижується медикаментозне навантаження на організм [333].

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень вирішено наукове завдання щодо вивчення видового спектру лактобацилярної мікробіоти як важливого компонента природних екосистем людського організму, поглиблено знання, що стосуються біологічної активності лактобацил у формуванні відповідних мікробіоценозів та шляхів їх стабілізації за умов дисбіотичних змін.

1. З організму практично здорових осіб за використання культурального метода лактобацили виділяються у різних відсоткових частках у залежності від природної екосистеми: найбільший відсоток з ротоглотки (81,1 %), 62,5% - з травного тракту і найменша кількість – 45 % з вагіни. У всіх екологічних нішах встановлено домінування виду *L. acidophilus* (30,3 %).

Видовий спектр усіх біотопів включає *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum* і *L. rhamnosus*, за виключенням *L. helveticus* (6,9 %) та *L. gasseri* (4,2 %), які представлені у вагінальному тракті. У всіх екосистемах переважали гетероферментативні лактобацили.

Зафіксовано дисоціацію у культурах лактобацил штаму *L. rhamnosus*, ізольованих від осіб з дисбіотичними порушеннями, за морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями.

2. Пробиотичні штами *L. plantarum* P17630, *L. acidophilus* KS 400, *L. plantarum* 8R-A3 спричиняють виражене пригнічення росту умовно-патогенних бактерій. *L. plantarum* 8R-A3 проявив найвищу активність відносно клінічних ізолятів *E. coli* та *P. aeruginosa*. Найвищу протигрибкову дію встановлено для *L. plantarum* P17630.

Ізоляти лактобацили від практично здорових жінок, проявляють більш виражену протигрибкову дію, ніж ізоляти від жінок з проявами вульвовагінального кандидозу. Відносно видів *C. non-albicans* антагонізму не виявлено.

3. Найвищі показники адгезивності до клітин букального епітелію встановлено для *L. acidophilus* ротоглотки ( $4,12 \pm 0,07$ ) *L. plantarum* вагіни ( $4,36 \pm 0,22$ ); для ізолятів травного тракту - для виду *L. casei* ( $4,66 \pm 0,04$ ). Середні значення адгезивності пробіотичних лактобацил були дещо вищими і для різних видів визначалися у межах  $4,4 \pm 0,18$  -  $5,18 \pm 0,03$ .

4. Встановлено відмінності в антибіотикочутливості ізолятів лактобацил, виділених з ротоглотки, та кишкових штамів, значною мірою чутливими до аміноглікозидів та тетрацикліну, які, зазвичай, є активними відносно представників ентеробактерій, що може бути непрямим свідченням міжвидового обміну генетичним матеріалом серед представників однієї екологічної ніші.

5. Пробіотичний штам *L. plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro* має здатність утворювати біоплівкову форму.

У змішаній культурі молочнокислі бактерії індукують загибель стафілококів, виділених із гною пустул хворих на *acne vulgaris*, які перебувають у біоплівковій формі, не переводячи її у планктонну. Визначальним фактором у клінічному перебігу вугрової хвороби є саме здатність бактерій до плівкоутворення, що підтверджено виявленням генів *icaA* та *icaD*.

6. Пробіотичний штам лактобацил (*L. plantarum* 8R-A3) виявляє більш виражений антагоністичний ефект на культури стафілокока в порівнянні з активністю клінічних ізолятів при збереженні мінімальної життєздатності біоплівкової форми стафілокока та індукує значні ультраструктурні зміни у клітинах стафілококів.

У змішаних культурах біоплівкових стафілококів з індигенними штамми лактобацил встановлено зростання кількості інволюційних і лізованих клітин, а також їх перехід у стан спокою, що зафіксовано ТЕМ.

7. При вивченні метаболічних факторів антагоністичної активності лактобацил встановлено індукцію інгібуючої дії нативних культур лактобацил на початку стаціонарної фази їхнього росту. Причому пригнічуюча антимікробна активність супернатанту лактобацил за умов нейтралізації дії гідрогена діоксиду і лактату не виявляється за відсутності живих клітин лактобацил та індуктивного



впливу біоплівкових штамів стафілококів *S. aureus*. Серед індигенних лактобацил саме представники виду *L. plantarum* виявляють найвищу активність.

8. За умов антибіотико-асоційованого дисбактеріозу відновлення вихідних кількісних рівнів лактобацил та біфідобактерій було досягнуто лише у відновний період серед мишей, яким не згодовували біопрепарати (спонтанне відновлення) та за умов використання аутоштамів лактобацил. Процес відновлення нормобіоценозу серед тварин обох груп практично не відрізнявся.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для лікування та профілактики інфекційних запальних процесів різної локалізації рекомендується включати пробіотичні препарати лактобацил (лактобактерин, гінофлор, гінолакт) у відповідності до їхнього видового складу, призначення та протимікробної активності.

Так, для лікування гнійно-запальних процесів, які спричиняються *S. aureus* та *P. aeruginosa* можуть бути рекомендовані препарати, які містять *L. plantarum* 8R-A3. Високо ефективною при лікуванні ешерихіозів та патогенних процесів є *L. plantarum* 8R-A3. Для лікування вульвовагінальних кандидозів, спричинених *C. albicans* та *C. non-albicans* рекомендовано препарати, які містять *L. plantarum* P17630.

У патогенезі *acne vulgaris* слід враховувати дисбіотичні порушення у інших екосистемах організму людини. З метою підвищення ефекту лікування *acne vulgaris* доцільно застосовувати як комбінування протимікробних хіміотерапевтичних препаратів з біопрепаратами лактобацил, так і комплексне лікування – внутрішнє застосування еубіотиків із засобами місцевої біотерапії.

### Список використаних джерел

1. Современные методы изучения микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека / Полуэктова Е. А., Ляшенко О. С., Шифрин О. С. и др. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014. № 2. С. 85-91.
2. Савченко Т. Н., Крамарь В. С. Микроэкология влагалища при дисбактериозе. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2011. № 5. С. 109-110.
3. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74, № 16. P. 4985-4996.
4. Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006. Vol. 124, № 4. P. 837-848.
5. The Prokaryotes. Vol. 4 : Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria / edit. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. New York : Springer-Verlag, 2006. 1140 p.
6. Bacteriocin production: a probiotic trait? / A. Dobson, P. D. Cotter, R. P. Ross, C. Hill. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78, № 1. P. 1-6.
7. Шумилов П. В. Нерешенные вопросы патогенеза воспалительных заболеваний кишечника у детей. Роль пристеночной микрофлоры кишечника. *Педиатрическая фармакология*. 2010. Т. 7, № 5. С. 54-58.
8. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals / E. Bauer, B. A. Williams, H. Smidt et al. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2006. Vol. 7, № 2. P. 35-52.
9. Community - based interference against integration of *Pseudomonas aeruginosa* into human salivary microbial biofilm / X. He, W. Hu, J. He et al. *Mol. Oral. Microbiol.* 2011. Vol. 26, № 6. P. 337-352.
10. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nature Rev. Microbiol.* 2009. Vol. 7, № 8. P. 555.
11. Гостев В. В., Сидоренко С. В. Бактериальные биопленки и инфекции. *Журнал инфектологии*. 2010. Т. 2, № 3. С. 4-15.

12. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections / N. Nair, R. Biswas, F. Götz, L. Biswas. *Infect. Immun.* 2014. Vol. 82, № 6. P. 2162-2169.
13. Pflughoeft K. J., Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2012. Vol. 7. P. 99-122.
14. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features / D. M. Saulnier, F. Santos, S. Roos et al. *PloS One.* 2011. Vol. 6, № 4. P. e18783.
15. Systematic review: faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children / S. Sha, J. Liang, M. Chen, B. Xu et al. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014. Vol. 39, № 10. P. 1003-1032.
16. Alonso V. R., Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br. J. Nutr.* 2013. Vol. 109, suppl. 2. P. S21-S26.
17. Effect of probiotics on the expression of Barrett's oesophagus biomarkers / N. B. Mozaffari, N. E. Daryani, A. Mirshafiey et al. *J. Med. Microbiol.* 2015. Vol. 64, № 4. P. 348-354.
18. Obesity-driven gut microbiota inflammatory pathways to metabolic syndrome / L. H. A. Cavalcante-Silva, J. G. Galvão, J. S. de França da Silva et al. *Front. Physiol.* 2015. Vol. 6. P. 341.
19. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy / J. S. Bajaj, J. M. Ridlon, P. B. Hylemon et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011. Vol. 302, № 1. P. G168-G175.
20. Manzo V. E., Bhatt A. S. The human microbiome in hematopoiesis and hematological disorders. *Blood.* 2015. Vol. 126, № 3. P. 311-318.
21. Donath M. Y., Shoelson S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011. Vol. 11, № 2. P. 98.
22. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders / J. Penders, E. E. Stobberingh, P. V. D. Brandt, C. Thijs. *Allergy.* 2007. Vol. 62, № 11. P. 1223-1236.

23. Конев Ю. В. Дисбиозы и их коррекция. *Consilium medicum*. 2005. Т. 7, № 6. С. 432-437.
24. Shreiner A., Huffnagle G. B., Noverr M. C. The “Microflora Hypothesis” of allergic disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. Vol. 635. P. 113-134.
25. Immunopathogenesis of bronchial asthma / M. Buc, M. Dzurilla, M. Vrlik, M. Bucova. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2009. Vol. 57, № 5. P. 331-344.
26. Войда Ю. В., Солонина Н. Л. Микроэкология человека и роль пробиотических препаратов в терапии гнойно-воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии. *Аннали Мечниковського інституту*. 2012. № 2. С. 27-37.
27. Анохин В. А., Тюрин Ю. А. Роль основных представителей анаэробной кишечной микрофлоры в норме и патологии. *Казанский медицинский журнал*. 2001. Т. 82, № 2. С. 149-151.
28. Глушанова Н. А., Блинов А. И. Биосовместимость пробиотических и резидентных лактобацилл. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. 2005. № 1-2. С. 105.
29. Host-bacterial mutualism in the human intestine / F. Bäckhed, E. Ley, J. L. Sonnenburg et al. *Science*. 2005. Vol. 307, № 5717. P. 1915-1920.
30. De Vos W. M. Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2015. Vol. 1. P. 15005.
31. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam et al. *Nature*. 2010. Vol. 464, № 7285. P. 59-65.
32. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / C. Huttenhower, D. Gevers, R. Knight et al. *Nature*. 2012. Vol. 486, № 7402. P. 207.
33. Pfefferle P. I., Renz H. The mucosal microbiome in shaping health and disease. *F1000Prime Rep*. 2014. Vol. 6. P. 11.
34. Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микрофлора и здоровье человека. К. : Червона Рута-Турс, 2008. 551 с.
35. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. Vol. 2, № 2. P. 95-108.

36. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? / M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnsholt, S. J. Sørensen. *Trends Microbiol.* 2014. Vol. 22, № 2. P. 84-91.
37. Macfarlane S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *J. Clin. Gastroenterol.* 2008. Vol. 42, suppl. 3. P. S142-S143.
38. Sperandio V. Deciphering bacterial language. *Nat. Chem. Biol.* 2009. Vol. 5, № 12. P. 870-871.
39. Звягинцева Т. Д., Чернобай А. И. Синдром избыточного бактериального роста: современные подходы к лечению. *Семейная медицина.* 2013. № 4 С. 31-38.
40. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components / M. C. L. Terraf, J. Tomás, M. E. F. Nader-Macías, C. Silva. *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 113, № 6. P. 1517-1529.
41. Confocal laser scanning microscopy analysis of *S. epidermidis* biofilms exposed to farnesol, vancomycin and rifampicin / N. Cerca, F. Gomes, S. Pereira et al. *BMC Res. Notes.* 2012. Vol. 5, № 1. P. 244.
42. Liévin-Le Moal V., Servin A. L. Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. Vol. 27, № 2. P. 167-199.
43. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009. Vol. 11, № 7. P. 1034-1043.
44. Harriott M. M., Noverr M. C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. Vol. 53, № 9. P. 3914-3922.
45. O'toole G. A. To build a biofilm. *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185, № 9. P. 2687-2689.
46. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates / L. Hall-Stoodley, L. Nistico, K. Sambanthamoorthy et al. *BMC Microbiol.* 2008. Vol. 8, № 1. P. 173.
47. Conformational dynamics of the essential sensor histidine kinase WalK / Cai Y., Su M., Ahmad A. et al. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2017. Vol. 73, № 10. P. 793-803.

48. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication / Eijsink V. G. H., Axelsson L., Diep D. B. et al. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81, № 1-4. P. 639-654.
49. Moslehi-Jenabian S., Vogensen F. K., Jespersen L. The quorum sensing luxS gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 2011. Vol. 149, № 3. P. 269-273.
50. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci / Li J., Wang W., Xu S. X. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108, № 8. P. 3360-3365.
51. Jones S. E., Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 35.
52. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components / M. C. Terraf, M. S. Juarez, M. E. Nader-Macias, C. Silva *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 113, № 6. P. 1517-1529.
53. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes et al. *Nature*. 2010. Vol. 464, № 7285. P. 59-65.
54. Майданник В. Г. Антибиотико-ассоциированная диарея у детей. Киев : Аванпост-Прим, 2011. 250 с.
55. Ширококов В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Новые стратегии в области создания и клинического использования пробиотиков. *Вісник фармакології та фармацевції*. 2010. № 2. С. 18-30.
56. Микрофлора кишечника и механизмы иммунорегуляции / С. С. Хромова, А. Н. Шкопоров, Б. А. Ефимов и др. *Вопросы детской диетологии*. 2005. Т. 3, № 1. С. 92-96.
57. Вуйич Г., Кнез А. Я., Штефанович В. Д. Действие перорального пробиотика Вагисан® на вагинальную флору женщин репродуктивного возраста: рандомизированное двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование. *Здоровье женщины*. 2015. № 2. С. 30-34.

58. Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах / О. І. Сідашенко, О. С. Воронкова, О. А. Сірокваша, А. І. Вінніков. *Вісник проблем біології і медицини*. 2013. Вип. 3, т. 2. С. 36-41.
59. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. Vol. 72, № 4. P. 728-764.
60. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters / K. Aagaard, J. Petrosino, W. Keitel et al. *FASEB J.* 2013. Vol. 27, № 3. P. 1012-1022.
61. Morgan X., Huttenhower C. Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology*. 2014. Vol. 146, № 6. P. 1437-1448.
62. Early life: gutmicrobiota and immune developmentininfancy / R. Martin, A. J. Nauta, K. Ben Amor et al. *Benef. Microbes*. 2010. Vol. 1, № 4. P. 367-382.
63. The placenta harbors a unique microbiome / K. Aagaard, J. Ma, K. M. Antony et al. *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6, № 237. P. 237ra65.
64. Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. *J. Nutr.* 2007. Vol. 137, № 1. P. 259S-266S.
65. Maccaferri S., Biagi E., Brigidi P. Metagenomics: key to humangutmicrobiota. *Dig. Dis.* 2011. Vol. 29, № 6. P. 525-530.
66. Regulatory immune cells inregulationof intestinal inflammatory response to microbiota / M. Sun, C. He, Y. Cong, Z. Liu. *Mucosal. Immunol.* 2015. Vol. 8, № 5. P. 969-978.
67. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease / L. Dethlefsen, M. McFall-Ngai, D. A. Relman et al. *Nature*. 2007. Vol. 449, № 7164. P. 811.
68. Brain-gut-microbe communication in health and disease / S. Grenham, G. Clarke, J. F. Cryan, T. G. Dinan. *Front. Physiol.* 2011. Vol. 2. P. 94.
69. ILSI Brazil international workshop on functional foods: a narrative review of the scientific evidence in the area of carbohydrates, microbiome, and health /



- M. E. Latulippe, A. Meheust, L. Augustin et al. *Food. Nutr. Res.* 2013. Vol. 57, № 1. P. 19214.
70. Малов В. А., Гюлазян Н. М. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: современное состояние проблемы. *Лечащий врач.* 2007. № 2. С. 16-18.
71. Soldavini J., Kaunitz J. D. Pathobiology and potential therapeutic value of intestinal short-chain fatty acids in gut inflammation and obesity. *Dig. Dis. Sci.* 2013. Vol. 5, № 10. P. 2756-2766.
72. Topping D. L., Clifton P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81, № 3. P. 1031-1064.
73. Gut Microflora: Digestive physiology and pathology / ed. by Rambaud J.-C., Buts J.-P., Corthier G., Flourié B. Paris : John Libbey eurotext, 2006. 247 p.
74. Tremaroli V., Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature.* 2012. Vol. 489, № 7415. P. 242-249.
75. Quigley E. M. M. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2013. Vol. 9, № 9. P. 560-569.
76. Probiotics and intestinal microbiota: implications in colon cancer prevention / K. Sivieri, R. Bedani, D. C. U. Cavallini, E. A. Rossi. *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes* / ed. by M. Kongo. [S. l.] : InTech, 2013. P. 2225-2499.
77. Кадельник Л. О. Сучасні уявлення про мікрофлору шлунково-кишкового тракту та чинники, що впливають інтестинальну мікрофлору. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2013. Т. 12, № 2. С. 207-213.
78. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическим методами / Г. А. Осипов, А. И. Парфенов, Н. В. Верховцева и др. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2003. № 4. С. 59-67.
79. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice / Mujico J. R., Vaccan G. C., Gheorghe A. et al. *Br. J. Nutr.* 2013. Vol. 110, № 4. P. 711-720.

80. Parfrey L. W., Knight R. Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012. Vol. 18, suppl. 4. P. 8-11.
81. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health / S. Matamoros, C. Gras-Leguen, F. Le Vacon et al. *Trends Microbiol.* 2013. Vol. 21, № 4. P. 167-173.
82. Koning C. J. M. Актуальные аспекты применения пробиотиков для профилактики и лечения антибиотикассоциированной диареи. *Сучасна гастроентерологія.* 2011. № 2. С. 83-88.
83. Ohland C. L., Macnaughton W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010. Vol. 298, № 6. P. G807-G819.
84. Stappenback T. S., Hooper L. V., Gordon J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002. Vol. 99, № 24. P. 15451-15455.
85. Dupont H. L. Review article: evidence for the role of gut microbiota in irritable bowel syndrome and its potential influence on therapeutic targets. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014. Vol. 39, № 10. P. 1033-1042.
86. Gastrointestinal function development and microbiota / A. Di Mauro, J. Neu, G. Riezzo et al. *Ital. J. Pediatr.* 2013. Vol. 39, № 1. P. 15.
87. Zambetti L. P., Mortellaro A. NLRPs, microbiota, and gut homeostasis: unravelling the connection. *J. Pathol.* 2014. Vol. 233, № 4. P. 321-330.
88. Influence of gastrointestinal microbiota on development of immune system in young animals / E. Bauer, B. A. Williams, H. Smidt et al. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2006. Vol. 7, № 2. P. 35-52.
89. Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabonomics / F. P. Martin, N. Sprenger, I. Montoliu et al. *J. Proteome Res.* 2010. Vol. 9, № 10. P. 5284-5295.
90. Host-gut microbiota metabolic interactions / J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross et al. *Science.* 2012. Vol. 336, № 6086. P. 1262-1267.

91. Obesity alters gut microbial ecology / R. E. Ley, F. Backhed, P. Turnbaugh et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005. Vol. 102, № 31. P. 11070-11075.
92. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice / J. J. Faith, N. P. McNulty, F. E. Rey, J. I. Gordon. *Science.* 2011. Vol. 333, № 6038. P. 101-104.
93. Шульпекова Ю. О. Кишечный микробиом как особый орган. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2014. Т. 24, № 6. С. 82-88.
94. Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism / H. C. Prasad, J. A. Steiner, J. S. Sutcliffe, R. D. Blakely. *Philos. Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci.* 2009. Vol. 364, № 1514. P. 163-173.
95. Manzo V. E., Bhatt A. S. The human microbiome in hematopoiesis and hematological disorders. *Blood.* 2015. Vol. 126, № 3. P. 311-318.
96. Изучение вагинальной и кишечной микрофлоры женщин в предродовом периоде и ее коррекция при дисбиотических нарушениях / В. С. Подгорский, Т. М. Лясковский, Н. К. Коваленко, Л. Т. Олещенко. *Мікробіологічний журнал.* 2006. № 2. С. 92-104.
97. Прилепская В. Н., Байрамова Г. Р. Вагинальная микозэкосистема влагалища в норме и при патологии. *Гинекология.* 2009. Т. 11, № 3. С. 4-6.
98. Spurbeck R. R., Arvidson C. G. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol.* 2011. Vol. 6, № 5. P. 567-582.
99. Нормальна мікрофлора уrogenітального тракту та її роль у підтриманні імунітету слизових оболонок / О. С. Воронкова, О. А. Сірокваша, Т. М. Полішко, А. І. Вінніков. *Вісник Дніпропетровського університету. Сер. Біологія. Екологія.* 2008. Вип. 16, т. 1. С. 51-56.
100. Черкасов С. В. Бактериальные механизмы колонизационной резистентности репродуктивного тракта женщин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2006. № 4. С. 100-105.

101. Волков Т. А., Большакова Г. М. Мікрофлора піхви у жінок репродуктивного віку в нормі і при різній патології (огляд літератури). *Аннали Мечниковського інституту*. 2009. № 1. С. 5-13.
102. Особенности микробиоценоза генитального тракта при беременности / Антонова О. Л., Говоруха И. Т., Гриценко Л. З., Чайка К. В. *Инфекции в акушерстве и гинекологии* / под ред. В. К. Чайки. Донецк : Альматео, 2006. С. 11-28.
103. Fowler R. S. Expansion of altered vaginal flora states in vaginitis to include a spectrum of microflora. *J. Reprod. Med.* 2007. Vol. 52, № 2. P. 93-99.
104. Thulkar J., Kriplani A., Agarwal N. A comparative study of oral single dose of metronidazole, tinidazole, secnidazole and ornidazole in bacterial vaginosis. *Ind. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 44, № 2. P. 243.
105. Vaginal microbiome of reproductive-age women / J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo et al. *Proc. Nat. Acad. Sci U S A*. 2011. Vol. 108, suppl. 1. P. 4680-4687.
106. Sahin-Yilmaz A., Naclerio R. M. Anatomy and physiology of the upper airway. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2011. Vol. 8, № 1. P. 31-39.
107. de Steenhuijsen P. W. A., Sanders E. A., Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos. Trans. R. Soc Lond B Biol. Sci.* 2015. Vol. 370, № 1675. P. 20140294.
108. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites / B. J. Paster, I. Olsen, J. A. Aas, F. E. Dewhirst. *Periodontology 2000*. 2006. Vol. 42, № 1. P. 80-87.
109. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS / C. S. Stingu, A. C. Rodloff, H. Jentsch et al. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008. Vol. 23, № 5. P. 372-376.
110. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces / D. L. Mager, L. A. Ximenez-Fyvie, A. D. Haffajee, S. S. Socransky. *J. Clin. Periodontol.* 2003. Vol. 30, № 7. P. 644-654.
111. Badet C., Thebaud N. B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol. J.* 2008. Vol. 2. P. 38.

112. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health / P. Koll, R. Mandar, H. Marcotte et al. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008. Vol. 23, № 2. P. 139-147.
113. Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota / J. Maukonen, J. Matto, M. L. Suihko, M. Saarela. *J. Med. Microbiol.* 2008. Vol. 57, № 12. P. 1560-1568.
114. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa / S. Ahrne, S. Nobaek, B. Jeppsson et al. *J. Appl. Microbiol.* 1998. Vol. 85, № 1. P. 88-94.
115. Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects / M. E. Colloca, M. C. Ahumada, M. E. Lopez, M. E. Nader-Macias. *Oral Dis.* 2000. Vol. 6, № 4. P. 227-233.
116. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns / M. G. Dominguez-Bello, E. K. Costello, M. Contreras et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 2010. Vol. 107, № 26. P. 11971-11975.
117. Belkaid Y., Hand T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation *Cell.* 2014. Vol. 157, № 1. P. 121-141.
118. Buffie C. G., Pamer E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Rev. Immunol.* 2013. Vol. 13, № 11. P. 790-801.
119. Квашніна Л. В., Родіонов В. П. Інтестинопротекторні властивості пробіотиків. *Здоров'є ребенка.* 2012. № 6. С. 41.
120. Янковский Д. С., Дымент Г. С. Современные аспекты проблемы микроэкологии и дисбиозов. *Здоров'є женщины.* 2005. № 4. С. 209-218.
121. A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth / R. Khoshini, S. C. Dai, S. Lezcano, M. Pimentel. *Dig. Dis. Sci.* 2008. Vol. 53, № 6. P. 1443-1454.
122. Костюкевич О. И. Современные представления о микробиоценозе кишечника. Дисбактериоз и его коррекция. *Русский медицинский журнал.* 2007. Т. 15, № 28. С. 2176-2182.

123. Ардатская М. Д., Минушкин О. Н. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции. *Consilium Medicum. Гастроэнтерология*. 2006. № 2. С.4-17.
124. Ентерогеморагічні ешерихії як небезпечні результати еволюції мікроорганізмів на сучасному етапі розвитку харчових технологій / В. І. Слободкін, С. М. Куріло, Н. Г. Шелкова, В. М. Левицька. *Проблеми харчування*. 2011. № 3-4. С. 17-28.
125. Shaw S., Blanchard J., Bernstein C. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 105, № 12. P. 2687-2692.
126. Assembly of the human intestinal microbiota / L. Dethlefsen, P. B. Eckburg, E. M. Bik, D. A. Relman. *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 21, № 9. P. 517-523.
127. Othman M., Agüero R., Lin H. C. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Cur. Opin. Gastroenterol.* 2008. Vol. 24, № 1. P. 11-16.
128. The microbiome: stress, health and disease / Moloney R. D., Desbonnet L., Clarke G. et al. *Mammalian Genome*. 2014. Vol. 25, № 1-2. P. 49-74.
129. Шендеров Б. А. Современное состояние и перспективы развития концепции пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков. *Пищевые ингредиенты*. 2005. № 2. С. 23-26.
130. Ширококов П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Мікробіом людини та сучасні методи його оздоровлення. *Інфекційні хвороби*. 2014. № 2. С. 64-69.
131. Butel M. J. Probiotics, gut microbiota and health. *Méd. Maladies Infect.* 2014. Vol. 44, № 1. P. 1-8.
132. New insights into probiotic mechanisms: a harvest from functional and metagenomic studies / J. Bienenstock, G. Gibson, T. R. Klaenhammer et al. *Gut Microbes*. 2013. Vol. 4, № 2. P. 94-100.
133. O'Toole P. W., Cooney J. C. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008. Vol. 2008. P. 175285.

134. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function / J. B. Ewaschuk, H. Diaz, L. Meddings et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008. Vol. 295, № 5. P. G1025-G1034.
135. Ivanov A. I., Parkos C. A., Nusrat A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am. J. Pathol.* 2010. Vol. 177, № 2. P. 512-524.
136. Resta-Lenert S., Barrett K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut.* 2003. Vol. 52, № 7. P. 988-997.
137. Plantarum prevents Enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction protein changes in intestinal epithelial cells / H. Qin, Z. Zhang, X. Hang, L. Y. Jiang. *BMC Microbiology.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 63.
138. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components / D. Ulluwishewa, R. C. Anderson, W. C. McNabb et al. *J. Nutrition.* 2011. Vol. 141, № 5. P. 769-776.
139. The therapeutic Effect of probiotic bacteria on gastrointestinal Diseases / Sarowska J., Choroszy-Krol I., Regulska-Ilow B. et al. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013. Vol. 22, № 5. P. 759-766.
140. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model / A. F. Mattar, D. H. Teitelbaum, R. A. Drongowski et al. *Pediatr. Surg. Int.* 2002. Vol. 18, № 7. P. 586-590.
141. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host–microbe interactions in the gastrointestinal tract / R. Sengupta, E. Altermann, R. C. Anderson et al. *Mediators Inflamm.* 2013. Vol. 2013. P. 237921.
142. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements / P. M. Sherman, K. C. Johnson-Henry, H. P. Yeung et al. *Infect. Immun.* 2005. Vol. 73, № 8. P. 5183-5188.

143. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions / P. D. Aldridge, M. A. Gray, B. H. Hirst, C. M. Anjam Khan. *Mol. Microbiol.* 2005. Vol. 55, № 3. P. 655-663.
144. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* in vitro / A. Abdel-Daim, N. Hassouna, M. Hafez et al. *Biomed Res. Int.* 2013. Vol. 2013. P. 680605.
145. Collado M. C., Meriluoto J., Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 2008. Vol. 226, № 5. P. 1065-1073.
146. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 / B. Kos, J. Suskovic, S. Vukovic et al. *J. Appl. Microbiol.* 2003. Vol. 94, № 6. P. 981-987.
147. Atassi F., Servin A. L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010. Vol. 304, № 1. P. 29-38.
148. Campan R., van Hemert S., Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens.* 2017. Vol. 9, № 1. P. 12.
149. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118 / S. C. Corr, Y. Li, C. U. Riedel et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 2007. Vol. 104, № 18. P. 7617-7621.
150. Perez R. H., Zendo T., Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* 2014. Vol. 13, suppl 1. P. S3.
151. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid / S. C. De Keersmaecker, T. L. Verhoeven, J. Desair et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. Vol. 259, № 1. P. 89-96.



152. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane / H. L. Alakomi, E. Skyttä, M. Saarela et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66, № 5. P. 2001-2005.
153. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity / Pridmore R. D., Pittet A. C., Praplan F., Cavadini C. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. Vol. 283, № 2. P. 210-215.
154. Helicobacter pylori and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increase AP endonuclease-1/redox factor-1 expression in human gastric epithelial cells / S. Z. Ding, A. M. O'Hara, T. L. Denning et al. *Gastroenterology.* 2004. Vol. 127, № 3. P. 845-858.
155. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections / S. E. Hawes, S. L. Hillier, J. Benedetti et al. *J. Infect. Dis.* 1996. Vol. 174, № 5. P. 1058-1063.
156. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy / L. Donati, A. Di Vico, M. Nucci et al. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2010. Vol. 281, № 4. P. 589-600.
157. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (R<sub>xr</sub>)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (P<sub>par</sub> $\gamma$ ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies / P. Desreumaux, L. Dubuquoy, S. Nutten et al. *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 193, № 7. P. 827-838.
158. Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study / F. Cremonini, S. Di Caro, M. Covino et al. *Am. J. Gastroenterol.* 2002. Vol. 97, № 11. P. 2744-2749.
159. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract / V. Delcenserie, D. Martel, M. Lamoureux et al. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2008. Vol. 10, № 1-2. P. 37-54.
160. Asadullah K., Sterry W., Volk H. D. Interleukin-10 therapy - review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* 2003. Vol. 55, № 2. P. 241-269.
161. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice / M. L. Cross, R. R. Mortensen, J. Kudsk, H. S. Gill. *Med. Microbiol. Immunol.* 2002. Vol. 191, № 1. P. 49-53.

162. Madsen K. L. Enhancement of epithelial barrier function by probiotics. *J. Epithelial Biol. Pharmacol.* 2012. Vol. 5, suppl. 1. P. 55-59.
163. Collado M. C., Bauerl C., Perez-Martinez G. Defining the microbiota for developing new probiotics. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2012. Vol. 23, № 1. P. 18579.
164. Joint analysis of two microarray gene-expression data sets to select lung adenocarcinoma marker genes / H. Jiang, Y. Deng, H. S. Chen et al. *BMC Bioinformatics.* 2004. Vol. 5, № 1. P. 81.
165. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial / J. Kataria, N. Li, J. L. Wynn, J. Neu. *Nutr. Rev.* 2009. Vol. 67, № 9. P. 546-550.
166. Adams C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 2010. Vol. 23, № 1. P. 37-46.
167. Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli / K. A. Ryan, P. Daly, Y. Li et al. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008. Vol. 61, № 4. P. 831-834.
168. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria / M. L. Cross, A. Ganner, D. Teilab et al. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004. Vol. 42, № 2. P. 173-180.
169. Taverniti V., Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 2011. Vol. 6, № 3. P. 261.
170. Schachtsiek M., Hammes W. P., Hertel C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 70, № 12. P. 7078-7085.
171. Pillai A., Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2008. № 1. P. CD004611.
172. Deshpande G., Rao S., Patole S. Patole Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet.* 2007. Vol. 369, № 9573. P. 1614-1620.

173. Falagas M. E., Betsi G. I., Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007. Vol. 13, № 7. P. 657-664.
174. Boyle R. J., Tang M. L. K. The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 2006. Vol. 36, № 5. P. 568-576.
175. Meurman J. H., Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis.* 2007. Vol. 13, № 5. P. 443-451.
176. Ukibe K., Miyoshi M., Kadooka Y. Administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in diet-induced obesity. *Br. J. Nutr.* 2015. Vol. 114, № 8. P. 1180-1187.
177. Gut emotions-mechanisms of action of probiotics as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders / A. F. Slyepchenko, A. S. Carvalho, D. Cha et al. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2014. Vol. 13, № 10. P. 1770-1786.
178. Gnanavel S. Psychobiotics: the latest psychotropics. *Indian J. Psychol. Med.* 2015. Vol. 37, № 1. P. 110.
179. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods / S. Li, Y. Zhao, L. Zhang et al. *Food Chem.* 2012. Vol. 135, № 3. P. 1914-1919.
180. Shen S., Wong C. H. Bugging inflammation: role of the gut microbiota. *Clin. Transl. Immunology.* 2016. Vol. 5, № 4. P. e72.
181. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production / S.W. Kim, K. Y. Park, B. Kim et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 431, № 2. P. 258-263.
182. Rossi M., Amaretti A., Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients.* 2011. Vol. 3, № 1. P. 118-134.
183. Залесский В. Н., Великая Н. В., Омельчук С. Т. Влияние пробиотиков на воспалительный ответ и другие факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний. *Український медичний часопис.* 2014. № 6. С. 49-56.

184. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum* / M. C. Peral, M. M. Rachid, N. M. Gobbato et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. Vol. 16, № 3. P. 281-286.
185. Is there a ‘gut–brain–skin axis’? / P. Arck, B. Hardjiski, E. Hagen et al. *Exp. Dermatol.* 2010. Vol. 19, № 5. P. 401-405.
186. Інноваційні аспекти в патогенезі і терапії акне / Проценко Т. В., Проценко О. А., Бутурлинова А. С., Лукьянченко Е. Н. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія.* 2015. № 1. С. 29-32.
187. Immune modulation property of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (ST11) strain and impact on skin defenses / J. Benyacoub, N. Bosco, C. Blanchard et al. *Benef. Microbes.* 2013. Vol. 5, № 2. P. 129-136.
188. Bove W. P. Probiotics in acne and rosacea. *Cutis.* 2013. Vol. 92, № 1. P. 6.
189. Fernandez L., Hancock R. E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012. Vol. 25, № 4. P. 661-681.
190. Orman M. A., Brynildsen M. P. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57, № 7. P. 3230-3239.
191. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review / M. D. Seo, H. S. Won, J. H. Kim. *Molecules.* 2012. Vol. 17, № 10. P. 12276-12286.
192. Gallo R. L., Hooper L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 2012. Vol. 12, № 7. P. 503.
193. Tackling antibiotic resistance / K. Bush, P. Courvalin, G. Dantas et al. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. Vol. 9, № 12. P. 894.
194. Functional genomics of probiotic lactobacilli / T. R. Klaenhammer, E. Altermann, E. Pfeiler et al. *J. Clin. Gastroenterol.* 2008. Vol. 42, suppl. 3, pt. 2. P. S160-S162.
195. Pharmabiotics: bioactives from mining host-microbe-dietary interactions / Shanahan F., Stanton C., Ross R. P., Hill C. *Funct. Food Rev.* 2009. Vol. 1. P. 20-25.

196. Preidis G. A., Versalovic J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology*. 2009. Vol. 136, № 6. P. 2015-2031.
197. Boyle R. J., Robins-Browne R. M., Tang M. L. Probiotic use in clinical practice: what are the risks?. *Am. J. Clin. Nutrition*. 2006. Vol. 83, № 6. P. 1256-1264.
198. Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and other Biological Reference Standards : Technical Report Series, № 932, annex 2 / WHO, Expert Committee on Biological Standardization. Geneva : WHO, 2004.
199. Державна фармакопея України : в 3 т. 2-е вид. Харків : Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, 2015. Т. 1. 1128 с.
200. Няньковський С. Л., Івахненко О. С. Роль і місце пробіотиків у профілактиці й лікуванні алергії у дітей. *Дитячий лікар*. 2013. № 4. С. 24-31.
201. Snyderman D. R. The safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis*. 2008. Vol. 46, suppl. 2. P. S104-S111.
202. Doron S., Snyderman D. R. Risk and safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis*. 2015. Vol. 60, suppl. 2. P. S129-S134.
203. Lactobacillus probiotic use in cardiothoracic transplant recipients: a link to invasive Lactobacillus infection? / M. L. Luong, B. Sareyyupoglu, M. H. Nguyen et al. *Transpl. Infect. Dis*. 2010. Vol. 12, № 6. P. 561-564.
204. Ledoux D., Labombardi V. J., Karter D. *Lactobacillus acidophilus* bacteraemia after use of a probiotic in a patient with AIDS and Hodgkin's disease. *Int. J. STD AIDS*. 2006. Vol. 17, № 4. P. 280-282.
205. *Lactobacillus rhamnosus* septicemia in a diabetic patient associated with probiotic use: a case report / E. F. Zein, S. Karaa, A. Chemaly et al. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 2008. Vol. 66, № 2. P. 195-198.
206. A pain in the neck: probiotics for ulcerative colitis / Conen A., Zimmerer S., Frei R. et al. *Ann. Intern. Med*. 2009. 151, № 12. P. 895-897.

207. *Lactobacillus rhamnosus* infection in a child following bone marrow transplant / P. Kalima, R. G. Masterton, P. H. Roddie, A. E. Thomas. *J. Infection*. 1996. Vol. 32, № 2. P. 165-167.
208. Mathur S., Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review *Int. J. Food Microbiol.* 2005. Vol. 105, № 3. P. 281-295.
209. Thumu S. C. R., Halami P. M. Acquired resistance to macrolide–lincosamide–streptogramin antibiotics in lactic acid bacteria of food origin. *Indian J. Microbiol.* 2012. Vol. 52, № 4. P. 530-537.
210. Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage / D. Gevers, M. Danielsen, G. Huys, J. Swings. *Appl. Environment. Microbiol.* 2003. Vol. 69, № 2. P. 1270-1275.
211. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods / G. Klein, C. Hallmann, I. A. Casas et al. *J. Applied Microbiol.* 2000. Vol. 89, № 5. P. 815-824.
212. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged, noninfectious diarrhea in HIV patients on antiretroviral therapy: a randomized, placebo-controlled, crossover study / M. K. Salminen, S. Tynkkynen, H. Rautelin et al. *HIV Clin. Trials*. 2004. Vol. 5, № 4. P. 183-191.
213. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation: a randomized, double-blind trial / N. Rayes, D. Seehofer, T. Theruvath et al. *Am. J. Transplant.* 2005. Vol. 5, № 1. P. 125-130.
214. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland / M. K. Salminen, S. Tynkkynen, H. Rautelin et al. *Clin. Infect. Dis.* 2002. Vol. 35, № 10. P. 1155-1160.
215. Stadlbauer V. Immunosuppression and probiotics: are they effective and safe?. *Benef. Microbes*. 2015. Vol. 6, № 6. P. 823-828.
216. Бактеріологія і вірусологія : нормативне виробничо-практичне видання. Київ : МНІАЦ мед. статистики, МВЦ «Медінформ», 2014. Ч. 1. 460 с.

217. Бактеріологія і вірусологія : нормативне виробничо-практичне видання. Київ : МНІАЦ мед. статистики, МВЦ «Медінформ», 2014. Ч. 2. 472 с.
218. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т. А. Брилине, Х. П. Ленцнер, А. А. Ленцнер. *Лабораторное дело*. 1986. № 4. С. 210-212.
219. Адгезивні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення : метод. рек. / укл. Т. П. Осолодченко та ін. ; МОЗ України, АМН України, Укр.центр НМІ та ПЛР. Київ : Знання України, 2009. 19 с.
220. Дімова М. І. Пробиотичні властивості бактеріоциногенного штаму *Lactobacillus plantarum* Г3/3 (13). *Мікробіологічний журнал*. 2006. № 4. С. 47-54.
221. Лабораторные животные / Западнюк И. П. Западнюк В. И., Захария Е. А. и др. Киев : Вища школа, 1983. 383 с.
222. Визначення протимікробної дії препарату Гатимак на планктонні клітини та біоплівки штамів *Staphylococcus aureus in vitro* / А. Я. Циганенко, О. В. Лупай, М. М. Мішина, С. М. Граматюк. *Теоретична і експериментальна медицина*. 2012. № 1. С. 11-13.
223. Flow Cytometry Protocols / ed. by Hawley R., Hawley T. New York : Humana Press, 2004. P. 34-37. (Methods Molecular Biology, Vol. 263).
224. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance / D. V. Krysko, T. Vanden Berghe, E. Parthoens et al. *Methods Enzymol.* 2008. Vol. 442. P. 307-341.
225. Schlegel K., Fullekrug M. Weltweite Ortung von Blitzen: Jahre Schumann-Resonanzen. *Physik unserer Zeit*. 2002. Vol. 33, № 6. P. 256-261.
226. Уикли Б. С. Электронная микроскопия для начинающих. Москва : Мир, 1975. 338 с.
227. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ / Голдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П. и др. Москва : Мир, 1984. 303 с.
228. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation / Vasudevan P., Nair M. K. M.,

- Annamalai T., Venkitanarayanan K. S. *Vet. Microbiol.* 2003. Vol. 92, № 1-2. P. 179-185.
229. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product / Zhang H., Liu L., Hao Y. et al. *Microbiol. Immunol.* 2013. Vol. 57. № 11. P. 746-755.
230. Видовий спектр і антибіотикочутливість лактобактерій та грибів роду *Candida*, виділених з вагіни практично здорових жінок / І. В. Тимчук, Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, О. В. Кулик. *Biomed. Biosoc. Anthropol.* 2012. № 18. С. 91-95.
231. Лаврик Г. С., Тимчук І. В., Корнійчук О. П. Видовий спектр та чутливість до антимікробних препаратів лактобацил, виділених з вагіни практично здорових жінок. *XIII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського* : тези доповідей, 1-6 жовтня 2013р. м. Ялта. Ялта, 2013. С. 277.
232. Антагоністичні властивості лактобактерій, виділених з вагіни, відносно умовно-патогенної мікрофлори / Г. С. Лаврик, І. В. Тимчук, О. П. Корнійчук, Л. П. Костюк. *Biomed. Biosoc. Anthropol.* 2014. № 22. С. 99-103.
233. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Адгезивні властивості лактобацил, виділених з різних біотопів людського організму. *Довкілля і здоров'я* : збірник матеріалів науково-практичної конференції, 23 квітня 2015р. м. Тернопіль. Тернопіль, 2015. С. 122-123.
234. Адгезивні властивості лактобацил / Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М., Тимчук І. В. *Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу* : збірник наукових праць щорічної науково-практичної конференції з міжнародною участю, 21-22 травня 2015р. м. Львів. Львів, 2015. С. 124-126.
235. Лаврик Г. С. Характеристика адгезивних властивостей лактобацил - клінічних ізолятів та складників біопрепаратів. *Аннали Мечниковського інституту.* 2015. № 2. С. 200-203.



236. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М. Характеристика чутливості до антибактерійних препаратів лактобактерій, ізольованих з різних екологічних ніш. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2009. № 4. С. 68-73.
237. Патент на корисну модель 100849 Україна, МПК С 12 N 1/20. Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / Лаврик Г. С., Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П. ; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. № у 2015 02085 ; заявл. 10.03.15 ; опубл. 10.08.2015, Бюл. №15.
238. Патент на корисну модель 100850 Україна, МПК С 12 N 1/04. Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / Лаврик Г. С., Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П. ; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. № у 2015 02087 ; заявл. 10.03.15 ; опубл. 10.08.2015, Бюл. № 15.
239. Claesson M. J., Van Sinderen D., O'Toole P. W. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. Vol. 269, № 1. P. 22-28.
240. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3 : The Firmicutes / eds. De Vos P., Garrity G. M., Jones D. et al. 2nd ed. New York : Springer, 2009. P. 465-511.
241. Borges S., Silva J., Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2014. Vol. 289, № 3. P. 479-489.
242. Палійчук В. І., Рожко М. М., Куцик Р. В. Адгезивна активність бактеріальної і грибової флори ротової порожнини до базисних пластмас «Віосгіл-С» та «Фторакс». *Галицький лікарський вісник*. 2011. № 4. С. 52-55.
243. Лівінська О. П., Гармашева І. Л., Коваленко Н. К. Вплив тейхоєвих кислот пробіотичних лактобацил на мікробну адгезію до епітеліальних клітин. *Мікробіологічний журнал*. 2012. Т. 74, № 3. С. 16-22.
244. In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens are responsible for urogenital tract infections / P. R. De Gregorio, M. S. J. Tomás,

- M. C. L. Terraf, M. E. F. Nader-Macías. *J. Med. Microbiol.* 2014. Vol. 63, № 5. P. 685-696.
245. Реверсия антибиотикочувствительности молочнокислых бактерий в перевиваемых культурах лимфобластоидных клеток человека / Рыбалко С. Л., Лясковский Т. М., Подгорский В. С. и др. *Мікробіологічний журнал.* 2006. Т. 68, № 6. С. 43-51.
246. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing / L. Dethlefsen, S. Huse, M. L. Sogin et al. *PLoS Biol.* 2008. Vol. 6, № 11. P. e280.
247. Лаврик Г. С. Біосумісність індигенних та пробіотичних штамів лактобактерій в експерименті. *Світ медицини та біології.* 2016. Т. 12, № 2. С. 124-128.
248. Тимчук І. В. Колонізація шлунково-кишкового тракту здорових щурів грибами роду *Candida* в експерименті. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.* 2014. № 1. С. 38-43.
249. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. Vol. 15, № 2. P. 167-193.250.
250. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton. *Ann. Rev. Microbiol.* 2002. Vol. 56, № 1. P. 187-209.
251. Chmielewski R. A. N., Frank J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT Food Sci. Technol.* 2006. Vol. 39. P. 11-19.
252. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Біоплівкова форма стафілококів у моно- та бівидовій культурі в поєднанні з лактобацилами. *Біологічні Студії/Studia Biologica.* 2015. Т. 9, № 3. С. 89-98.
253. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Чувствительность к химиотерапевтическим противомикробным препаратам планктонных и биопленочных форм стафилококков. *Современные тенденции развития науки и технологий : сборник научных трудов по материалам VIII Международной научно- практической конференции, 30 ноября 2015 г. Белгород, 2015. С. 99-105.*

254. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Деструктуючий вплив лактобактерій на біоплівкову форму стафілококів. *Досягнення та перспективи розвитку мікробіології* : програма та тези доповідей міжнародної наукової конференції, 12-14 жовтня 2016 р., м. Львів. Львів, 2016. С. 85-87.
255. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М. Альтерація морфологічної структури стафілококів за культивування у змішаній культурі з лактобактобацилами (за даними електронно-мікроскопічного дослідження). *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2016. № 4. С. 28-32.
256. Lavryk G., Korniyuchuk O., Tymkiv M. Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli. *Regulatory Mechanisms Biosystems*. 2017. Vol. 8, № 1. P. 98-103.
257. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects / Arciola C. R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2015. Vol. 5. P. 7.
258. A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin plantaricin JK / Orpegard C., Kjos M., Veening J. W. et al. *Microbiol. Open*. 2016. Vol. 5, № 4. P. 700-708.
259. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Антимікробна активність лактобацил відносно стафілококів, виділених з біоплівок хворих *acne vulgaris*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2020. № 1. С. 69-79.
260. Ширококов В. П., Янковський Д. С., Димент Г. С. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом. Київ : Червона Рута-Турс, 2009. 312 с.
261. Старішко О. М. Особливості складу мікрофлори урогенітального тракту жінок. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. № 1. С. 59-63.
262. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina / L. M. Pascual, M. B. Daniele, F. Ruiz et al. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 54, № 3. P. 141-148.
263. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide / S. S. Witkin, S. Alvi, A. M. Bongiovanni et al. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011. Vol. 61, № 2. P. 153-158.

264. Kaewsrichan J., Peeyananjarassri K., Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006. Vol. 48, № 1. P. 75-83.
265. Influence of vaginal bacteria and d- and l-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections / S. S. Witkin, H. Mendes-Soares, I. M. Linhares et al. *mBio.* 2013. Vol. 4, № 4. P. e00460-13.
266. Srinivasan S., Fredricks D. N. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008. Vol. 2008. P. 750479.
267. Sobel J. D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet.* 2007. Vol. 369, № 9577. P. 1961-1971.
268. Aleshkin V. A., Voropaeva E. A., Shenderov B. A. Vaginal microbiota in healthy women and patients with bacterial vaginosis and nonspecific vaginitis. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2006. Vol. 18, № 2. P. 71-74.
269. Falagas M. E., Betsi G. I., Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. Vol. 58, № 2. P. 266-272.
270. Русакова М. Ю. Утворення полівидової біоплівки молочнокислими бактеріями *Lactobacillus plantarum* P17630 та дріжджоподібними грибами *Candida albicans* ATCC 18804. *Мікробіологія і біотехнологія.* 2016. № 2. С. 41-53.
271. Antifungal susceptibilities of *Candida species* causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases / S. S. Richter, R. P. Galask, S. A. Messer et al. *J. Clin. Microbiol.* 2005. Vol. 43, № 5. P. 2155-2162.
272. Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic candida species / B. Y. Bulgasem, M. N. Lani, Z. Hassan et al. *Mycobiology.* 2016. Vol. 44, № 4. P. 302-309.
273. Anti-Adhesion Activity of Lactic Acid Bacteria Supernatant against Human Pathogenic Candida Species Biofilm / Bulgasem Y. Bulgasem, Zaiton Hassan, Nagea K. A. Abdalsadiq et al. *Health Sci. J.* 2015. Vol. 9, № 6. P. 1-9.

274. Kariptaş E., Tulumoğlu Ş., Erdem B. Antifungal effects of *Lactobacillus* spp. bacteria on *Candida* yeast. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 2010. Vol. 16, № 6. P. 1061-1064.
275. Probiotics administered intravaginally as a complementary therapy combined with antibiotics for the treatment of bacterial vaginosis: a systematic review protocol / L. Ma, J. Su, Y. Su et al. *BMJ Open.* 2017. Vol. 7, № 10. P. e019301.
276. Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion / W. Zhang, H. Wang, J. Liu et al. *Anaerobe.* 2013. Vol. 22. P. 97-103.
277. Kremleva E. A., Chercasov S. V., Bukharin O. V. Influence of microbial-epithelial interactions on biological characteristics of vaginal microflora. *Zh. Microbial.* 2011. Vol. 2. P. 53-57.
278. Бухарин О. В., Кремлева Е. А., Черкасов С. В. Особенности эпителиально-бактериальных взаимодействий при бактериальном вагинозе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012. № 3. С. 3-8.
279. Zárate G., Nader-Macias M. E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. Vol. 43, № 2. P. 174-180.
280. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens / D. Rönnqvist, U. Forsgren-Brusk, U. Husmark, E. Grahn-Nåkansson. *J. Med. Microbiol.* 2007. Vol. 56, № 11. P. 1500-1504.
281. Микробная экология влагалища / Ефимов Б. А., Коршунова О. В., Кафарская Л. И. и др. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2002. № 6. С. 91-99.
282. The extracellular biology of the lactobacilli / M. Kleerebezem, P. Hols, E. Bernard et al. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 34, № 2. P. 199-230.
283. Гармашева І. Л., Коваленко Н. К. Адгезія різних видів молочнокислих бактерій залежно від групи крові системи АВ0. *Мікробіологічний журнал.* 2006. Т. 68, № 5. С. 62-68

284. Бондаренко В. М. Прикладные аспекты молекулярной биологии бифидобактерий и лактобацилл. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2006. № 2. С. 89-87.
285. Natural sesquiterpene lactones enhance oxacillin and gentamicin effectiveness against pathogenic bacteria without antibacterial effects on beneficial lactobacilli / E. Cartagena, M. Alva, S. Montanaro, A. Bardón. *Phytother. Res.* 2015. Vol. 29, № 5. P. 695-700.
286. In vitro probiotic potential of *Lactobacillus spp.* isolated from fermented milks / A. F. Cunha, L. B. Acurcio, B. S. Assis et al. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2013. Vol. 65, № 6. P. 1876-1882.
287. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria / A. S. Hummel, C. Hertel, W. H. Holzapfel, C. M. Franz. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 73, № 3. P. 730-739.
288. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses / N. Belletti, M. Gatti, B. Bottari et al. *J. Food Prot.* 2009. Vol. 72, № 10. P. 2162-2169.
289. Antibiogram of lactobacilli isolated from four different niches / James L., Beena A. K., Anupa A., Sreeshma N. *J. Microbiol. Microb. Technol.* 2016. Vol. 1, № 1. P. 4.
290. Condon S. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. *Irish. J. Food Sci. Technol.* 1983. Vol. 7. P. 15-25.
291. Ammor M. S., Flórez A. B., Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 2007. Vol. 24, № 6. P. 559-570.
292. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products / R. Temmerman, B. Pot, G. Huys, J. Swings. *Int. J. Food Microbiol.* 2003. Vol. 81, № 1. P. 1-10.
293. Topical treatment of infectious vaginitis: effects of antibiotic, antifungal and antiseptic drugs on the growth of normal vaginal *Lactobacillus* strains / C. Neut, F. Verrière, H. J. Nelis, T. Coenye. *Open J. Obstet. Gynecol.* 2015. Vol. 5, № 3. P. 173.

294. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains / Karapetkov N., Georgieva R., Rumyan N., Karaivanova E. *Benef. Microbes*. 2011. Vol. 2, № 4. P. 335-339.
295. Gevers D., Huys G., Swings J. *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. Vol. 225, № 1. P. 125-130.
296. Horizontal transfer of tet (M) and erm (B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats / Jacobsen L., Wilcks A., Hammer K. et al. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. Vol. 59, № 1. P. 158-166.
297. Gorkiewicz G. Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009. Vol. 33, suppl. 1 P. S37-S41.
298. Дармов И. В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И. В. Дармов И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский и др. *Журнал инфектологии*. 2012. Т. 4, № 1. С. 68-74.
299. Макаренко О. М., Петров П. І., Лугіна С. В. Сучасний погляд на проблему профілактики та лікування дисбактеріозу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2016. Т. 16, № 2. С. 54.
300. Ардатская М. Д. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции. *Consilium medicum*. 2008. Т. 10 № 8. С. 86-92.
301. Глушанова Н. А., Шендеров Б. А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro*. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003. № 2. С. 56-61.
302. Suvorov A. Gut microbiota, probiotics and human health. *Biosci. Microbiota Food Health*. 2013. Vol. 32, № 3. P. 81-93.
303. Аутибиотикотерапия / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских и др. *Журнал инфектологии*. 2013. Т. 5, № 4. С. 43-54.

304. Пат. 2477894 Российская Федерация, МКИ6 С 01 D 23/28. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных / Чичерин И. Ю., Ердякова А. С., Дармов И. В. и др. ; заявл. 05.12.2011; опубл. 20.03.2013, Бюл. №1.
305. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives / С. Charlier, M. Cretenet, S. Even, Y. Le Loir. *Int. J. Food Microbiol.* 2009. Vol. 131, № 1. P. 30-39.
306. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections / H. F. Wertheim, D. C. Melles, M. C. Vos et al. *Lancet Infect. Dis.* 2005. Vol. 5, № 12. P. 751-762.
307. Bojar R. A., Holland K. T. Acne and Propionibacterium acnes. *Clin. Dermatol.* 2004. Vol. 22, № 5. P. 375-379.
308. Kober M. M., Bowe W. P. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging. *Int. J. Women's Dermatol.* 2015. Vol. 1, № 2. P. 85-89.
309. Перифолликулярная микробиота кожи при акне. Часть I. Общие характеристики колонизации и резистентность к системным антибиотикам / Г. Н. Бурцева, А. Ю. Сергеев, В. Г. Арзуманян, Ю. Ю. Сергеев. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2013. № 2. С. 84-93.
310. Skin microbiome and *acne vulgaris*: *Staphylococcus*, a new actor in acne / B. Dreno, R. Martin, D. Moyal et al. *Exp. Dermatol.* 2017. Vol. 26, № 9. P. 798-803.
311. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states / S. A. Rani, B. Pitts, H. Beyenal et al. *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189, № 11. P. 4223-4233.
312. Fey P. D., Olson M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 2010. Vol. 5, № 6. P. 917-933.
313. Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance / J. W. Kim, G. T. Chung, J. S. Yoo et al. *J. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 61, № 10. P. 1428-1434.
314. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect /



E. Dosunmu, A. A. Chaudhari, S. R. Singh et al. *Int. J. Nanomedicine*. 2015. Vol. 10. P. 5025.

315. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74, № 7. P. 2171-2178.

316. Effect of low temperature on growth and ultrastructure of *Staphylococcus spp.* / Onyango L. A., Dunstan R. H., Gottfries J. et al. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 1. P. e29031.

317. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens / K. Sambanthamoorthy, X. Feng, R. Patel et al. *BMC Microbiol.* 2014. Vol. 14, № 1. P. 197.

318. Hynönen U., Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, № 12. P. 5225-5243.

319. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli / J. A. Younes, H. C. van der Mei, E. van den Heuvel et al. *PloS One*. 2012. Vol. 7, № 5. P. e36917.

320. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis / M. A. Golowczyc, P. Mobili, G. L. Garrote et al. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. Vol. 118, № 3. P. 264-273.

321. Rasmussen T. B., Givskov M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006. Vol. 296, № 2-3. P. 149-161.

322. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide / J. Valle, S. Da Re, N. Henry et al. *Proc. Nat. Acad. Sci U S A*. 2006. Vol. 103, № 33. P. 12558-12563.

323. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum* / Peral M. C., Rachid M. M., Gobbato N. M. et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. Vol. 16, № 3. P. 281-286.

324. Prince T., McBain A. J., O'Neill C. A. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78, № 15. P. 5119-5126.

325. Characterization and application of an anti - *Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05–10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China / Huang Y., Luo Y. B., Zhai Z. Y. et al. *Food Control*. 2009. Vol. 20. P. 1030-1035.
326. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against foodborne pathogenic microorganisms / M. P. Arena, A. Silvain, G. Normanno et al. *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7. P. 464.
327. Impact of environmental factors on bacteriocin promotor activity in gut-derived *Lactobacillus salivarius* / Guinane C., Piper C., Draper L. A. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Vol. 81, № 22. P. 7851-7859.
328. Wayah S. B., Philip K. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. *Microb. Cell Fact.* 2018. Vol. 17, № 1. P. 125.
329. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: oscypek and korycinski cheese / Ołdak A., Zielińska D., Rzepkowska A., Kołożyn-Krajewska D. *Biomed Res. Int.* 2017. Vol. 2017. P. 6820369.
330. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland / Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W. *Food Control*. 2012. Vol. 26, № 1. P. 117-124.
331. Belicová A., Mikulášová M., Dušinský R. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *Biomed Res. Int.* 2013. Vol. 2013. P. 760298.
332. Physiologic effect of a probiotic on the skin / Muizzuddin N., Maher W., Sullivan M. et al. *J. Cosmet. Sci.* 2012. Vol. 63, № 6. P. 385-395.
333. Prospective randomized open-label trial comparing the safety, efficacy and tolerability of an acne treatment regimen with and without a probiotic supplement in subjects with mild to moderate acne / Jung G. W., Tse J. E., Guiha I., Rao J. *J. Cutan. Med. Surg.* 2013. Vol. 17, № 2. P. 114-122.

### Наукові статті у фахових виданнях

1. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М. Характеристика чутливості до антибактерійних препаратів лактобактерій, ізольованих з різних екологічних ніш. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2009. № 4. С. 68-73. *(Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію бактерій роду Lactobacillus spp., встановлено чутливість до антимікробних препаратів, статистичну обробку матеріалу, підготовлено статтю до друку).*
2. Видовий спектр і антибіотикочутливість лактобактерій та грибів роду *Candida*, виділених з вагіни практично здорових жінок / І. В. Тимчук, Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, О. В. Кулик. *Biomed. Biosoc. Anthropol.* 2012. № 18. С. 91-95. *(Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію бактерій роду Lactobacillus spp., встановлено чутливість до антимікробних препаратів, статистичну обробку матеріалу, підготовлено статтю до друку).*
3. Антагоністичні властивості лактобактерій, виділених з вагіни, відносно умовно-патогенної мікрофлори / Г. С. Лаврик, І. В. Тимчук, О. П. Корнійчук, Л. П. Костюк. *Biomed. Biosoc. Anthropol.* 2014. № 22. С. 99-103. *(Дисертантом сплановано і виконано експеримент, проведено аналіз наукової літератури та отриманих результатів, підготовлено статтю до друку).*
4. Лаврик Г. С. Характеристика адгезивних властивостей лактобацил - клінічних ізолятів та складників біопрепаратів. *Аннали Мечниковського інституту*. 2015. № 2. С. 200-203. *(Дисертантом сплановано і виконано експеримент, опрацьовано дані літератури, проведено узагальнення результатів, підготовлено статтю до друку).*
5. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Чувствительность к химиотерапевтическим противомикробным препаратам планктонных и биопленочных форм стафилококков. *Современные тенденции развития науки и технологий : сборник научных трудов по материалам VIII Международной научно- практической конференции, 30 ноября 2015 г. Белгород, 2015.* С. 99-105. *(Дисертантом проведено виділення*

та ідентифікацію мікроорганізмів, встановлено чутливість до антимікробних препаратів, статистичну обробку матеріалу, підготовлено статтю до друку).

6. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Біоплівкова форма стафілококів у моно- та бівидовій культурі в поєднанні з лактобацилами. *Біологічні Студії/Studia Biologica*. 2015. Т. 9, № 3. С. 89-98. (Дисертантом сплановано і виконано експеримент, опрацьовано дані літератури, проведено узагальнення результатів, підготовлено статтю до друку).

7. Лаврик Г. С. Біосумісність індигенних та пробіотичних штамів лактобактерій в експерименті. *Світ медицини та біології*. 2016. Т. 12, № 2. С. 124-128. (Дисертантом проведено експериментальну частину по створенню антибіотико-асоційованого дисбактеріозу у мишей, опрацьовано дані літератури, облік результатів експерименту, підготовлено статтю до друку).

8. Lavryk G., Korniychuk O., Tymkiv M. Ultrastructural changes in biofilm forms of staphylococci cultivated in a mixed culture with lactobacilli. *Regulatory Mechanisms Biosystems*. 2017. Vol. 8, № 1. P. 98-103. (Дисертантом проведено забір клінічного матеріалу, виділення та ідентифікація мікроорганізмів, експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку матеріалу, огляд літератури, підготовлено статтю до друку).

9. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М. Альтерація морфологічної структури стафілококів за культивування у змішаній культурі з лактобацилами (за даними електронно-мікроскопічного дослідження). *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2016. № 4. С. 28-32. (Дисертантом проведено забір клінічного матеріалу, виділення та ідентифікація мікроорганізмів, експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку матеріалу, огляд літератури, підготовлено статтю до друку).

10. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Антимікробна активність лактобацил відносно стафілококів, виділених з біоплівок хворих *asne vulgaris*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2020. № 1. С. 69-79. (Дисертантом сплановано і виконано

*експеримент, опрацьовано дані літератури, проведено узагальнення результатів, підготовлено статтю до друку).*

### **Тези доповідей та матеріали конференцій, з'їздів**

11. Лаврик Г. С., Тимчук І. В., Корнійчук О. П. Видовий спектр та чутливість до антимикробних препаратів лактобацил, виділених з вагіни практично здорових жінок. *XIII з'їзд Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського: тези доповідей*, 1-6 жовтня 2013р. м. Ялта. Ялта, 2013. С. 277.

12. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Адгезивні властивості лактобацил, виділених з різних біотопів людського організму. *Довкілля і здоров'я : збірник матеріалів науково-практичної конференції*, 23 квітня 2015р. м. Тернопіль. Тернопіль, 2015. С. 122-123.

13. Адгезивні властивості лактобацил / Лаврик Г. С., Корнійчук О. П., Бурова Л. М., Тимчук І. В. *Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу: збірник наукових праць щорічної науково-практичної конференції з міжнародною участю*, 21-22 травня 2015р. м. Львів. Львів, 2015. С. 124-126.

14. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Деструктуючий вплив лактобактерій на біоплівкову форму стафілококів. *Досягнення та перспективи розвитку мікробіології: програма та тези доповідей міжнародної наукової конференції*, 12-14 жовтня 2016 р., м. Львів. Львів, 2016. С. 85-87.

### **Патенти:**

15. Патент на корисну модель 100849 Україна, МПК С 12 N 1/20. Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / Лаврик Г. С., Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ. ім. Д. Галицького. № у 2015 02085 ; заявл. 10.03.15 ; опубл. 10.08.2015, Бюл. №15.

16. Патент на корисну модель 100850 Україна, МПК С 12 N 1/04. Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus* / Лаврик Г. С., Павлій С. Й., Павлій Р. Б., Корнійчук О. П.; заявник і патентовласник Львів. нац. мед. універ.

ім. Д. Галицького. № и 2015 02087 ; заявл. 10.03.15 ; опубл. 10.08.2015, Бюл. № 15.

**" ЗАТВЕРДЖУЮ "**

Проректор з науково-дослідної роботи  
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний  
університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України»

Д. біол. н, проф. \_\_\_\_\_ І.М. Кліщ

« 24 » \_\_\_\_\_ 2017 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus*
2. Установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, 79010, Львів, вул. Пекарська, 69; автори: Лаврик Г.С., Павлій С.Й., Павлій Р.Б., Корнійчук О.П.
3. Джерело інформації: Патент № 100849. - Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus*. - опубл. 10.08.2015, Бюл. №15.
4. Де впроваджено: Впроваджено в навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (протокол засідання № 5 від 21.11.2017р.) на лекціях і практичних заняттях медичного, фармацевтичного та стоматологічного факультетів з тем, присвячених нормальній мікрофлорі людини, та її наукову діяльність
5. Термін впровадження з 2016 по 2017 роки
6. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями вкладеними у джерелі інформації: поліпшено знання студентів щодо умов культивування лактобактерій; запропонованим способом досягається підвищення ефективності культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus* при дослідженні мікробіоценозів товстої кишки.

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач кафедрою мікробіології, вірусології  
та імунології ДВНЗ «Тернопільський державний  
медичний університет ім. І.Я. Горбачевського»  
МОЗ України,  
Доктор медичних наук, професор

*С.І. Климнюк*

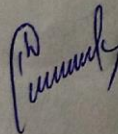
«ЗТВРДЖЕНО»  
 Проректор з науково-педагогічної роботи  
 ВДНЗ України «Буковинський державний  
 медичний університет»  
 доцент Ратуш І.В.  
 « 21 » \_\_\_\_\_ 2017 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus*  
 \_\_\_\_\_  
 (найменування пропозиції для впровадження)
  
2. Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,  
 кафедра мікробіології, вірусології та імунології, 79010, Львів, вул. Пекарська, 69;  
 автори: Лаврик Г.С., Павлій С.Й., Павлій Р.Б., Корнійчук О.П.  
 \_\_\_\_\_  
 (установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів)
  
3. Джерело інформації: Патент № 100850. - Спосіб зберігання мікроорганізмів роду  
*Lactobacillus*. – опубл. 10.08.2015, Бюл.№15.  
 \_\_\_\_\_  
 (назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.)
  
4. Впроваджено в навчальний процес кафедри мікробіології та вірусології ВДНЗ України  
 «Буковинський державний медичний університет»  
 \_\_\_\_\_  
 (найменування лікувально-профілактичного закладу)
  
5. Термін впровадження: з 2016 по 2017 роки
  
6. Загальна кількість відповідних тематичних лекцій та практичних занять: згідно  
 календарно-тематичного плану кафедри.
  
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями вкладеними у джерелі  
 інформації: запропонованим способом досягається подовження терміну активності та  
 зберігання властивостей мікроорганізмів роду *Lactobacillus* до 36 місяців.

#### Відповідальний за впровадження

завідувач кафедри мікробіології та вірусології  
 (посада, підпис, ім'я, по батькові, прізвище)



д.мед.н., проф. Дейнека С.С.

« 21 » \_\_\_\_\_ 2017р.





"ЗАТВЕРДЖУЮ"  
 Ректор  
 Львівського національного медичного  
 університету імені Данила Галицького  
 академік НАМН України,  
 Б.С. Зменковський  
 » січня 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Спосіб зберігання мікроорганізмів роду *Lactobacillus*

(найменування пропозиції для впровадження)

2. Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, 79010, Львів, вул. Пекарська, 69; автори: Лаврик Г.С., Павлій С.Й., Павлій Р.Б., Корнійчук О.П.

(установа, що розробила, її поштова адреса, прізвище, ім'я, по батькові авторів)

3. Джерело інформації: Патент № 100850. - Спосіб культивування мікроорганізмів роду *Lactobacillus*. - опубл. 10.08.2015, Бюл.№15.

(назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні дані статті, № а.с. і т.п.)

4. Впроваджено в навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

(найменування лікувально-профілактичного закладу)

5. Термін впровадження з 2015 по 2017 роки

6. Загальна кількість відповідних тематичних лекцій та практичних занять: згідно календарно-тематичного плану кафедри

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями вкладеними у джерелі інформації: запропонованим способом досягається подовження терміну активності та зберігання властивостей мікроорганізмів роду *Lactobacillus* до 36 місяців.

#### Відповідальний за впровадження

завідувач кафедри мікробіології

(посада, підпис, ім'я, по батькові, прізвище)

" 9 " січня 2018 р.

д.мед.н., проф. Корнійчук О.П.