

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ПІДХОДІВ ДО КОРЕКЦІЇ МІКРОБІОЦЕНОЗІВ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Калініченко С. В., Дубініна Н. В.

ВСТУП

Запальні захворювання верхніх дихальних шляхів за поширеністю посідають перше місце в структурі патології ЛОР-органів людини, причому вельми актуальними нозокоміальними інфекціями верхніх дихальних шляхів (далі – ВДШ) є інфекції стафілококового генезу¹. Найбільш поширеним джерелом *Staphylococcus aureus* є практично здорові носії серед пацієнтів та медичних, педагогічних і фармацевтичних працівників. Відомо, що за бактеріоносійства відбувається перебудова механізмів захисту макроорганізму з формуванням імунологічного дисбалансу².

Традиційні методи санації бактеріоносіїв за допомогою антибактеріальних препаратів є малоефективними – носійство з часом відновлюється та потребує повторних курсів лікування, а застосування повторних курсів антибіотиків призводить до ще більшого пригнічення імунної системи носія та формування антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів³. Стратегічним напрямом ВООЗ вважає поступове заміщення антибіотиків на профілактичні засоби нових поколінь (WHO, 2017). Крім того, нераціональна антибіотикотерапія сприяє формуванню резистентності, вона призводить і до мікроекологічних порушень. Зазначене зумовлює напрям наукових досліджень щодо визначення шляхів відновлення мікрофлори ВДШ. Одним із них може бути застосування для

¹ Kalinichenko S.V. Modern aspects of development of anty-staphylococcal drugs of a new generation based on *S. aureus* adhesins and probiotic strains of Lactobacilli. *Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine*: Collective monograph. Riga: Izdevnieciba «Baltija Publishing». 2020. 344 p. P. 175–192. DOI: 10.30525/978-9934-588-64-8-10.

² The use bacterial lysates in the complex treatment of patients with chronic decompensated tonsillitis / Manee Hans, Sklyar N.I., Kalinichenko S.V., Markovich I.G. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2017. № 4. P. 46–52. DOI: 10.5281/zenodo.1133777.

³ Імунологічні показники у хворих на хронічний тонзиліт при лікуванні традиційними методами та із застосуванням високоенергетичного лазера / Ханс Мані та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018. Вип. 1. Т. 1 (142). С. 209–212. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-209-212.

відновлення зазначеної еконіши пробіотичних штамів, що мають високу антагоністичну активність відносно патогенної та умовно патогенної мікрофлори. Пошукові дослідження останніх років дозволяють зробити припущення про можливість використання певних пробіотичних штамів як регуляторів мікробіоценозів за інфекцій верхніх дихальних шляхів⁴.

Як ключовий фактор колонізації будь-якої еконіші макроорганізму грампозитивні бактерії використовують поверхневі молекулярні структури. Оскільки інфекційний процес ініціюється після адгезії та колонізації мікроорганізмами мукозальної поверхні слизових оболонок, то якщо можливо впливати на патогенні бактерії в початковій стадії колонізації макроорганізму – пригнічувати адгезію бактерій, то можливо пригнічувати й розвиток інфекційного процесу. Зазначене формує основу антиадгезивної стратегії розроблення імунобіологічних препаратів нового покоління.

У розробленні імунобіологічних препаратів нового класу науковці пропонують використовувати саме такі патоген-асоційовані молекулярні структури (ПАМС), оскільки вони запускають механізми вродженого й адаптивного імунітету, блокують поверхневі епітопи, що перешкоджає адгезії бактерій і, таким чином, сприяє попередженню розвитку інфекції. Для блокування відповідних рецепторів на слизових оболонках носової порожнини можуть бути застосовані нативні поверхневі мікробні антигени⁵.

Отримання нативних поверхневих антигенів за допомогою фізичних чинників надає можливість не застосовувати хімічні речовини, які можуть негативно впливати на організм людини⁶. До того ж застосування фізичних чинників сприятиме стандартизації

⁴ Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children (A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials) / Yizhong Wang, Xiaolu Li, Ting Ge, Yongmei Xiao, Yang Liao, Yun Cui, Yucai Zhang, Wenzhe Ho, Guangjun Yu, Ting Zhang. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Aug. № 95(31). P. e4509 DOI: 10.1097/MD.0000000000004509.

⁵ Study of the effect of diphtheria bacterial antigenic preparation obtained by means of electromagnetic radiation of extremely high frequency, on the formation of humoral antitoxic immunity and colonization resistance in experimental animals / I.V. Yeliseyeva, Ye.M. Babich, L.A. Zhdamarova, V.I. Belozersky, S.A. Kolpak, O.K. Balak. *Bulletin of Biology and Medicine*. 2015. Issue 3. T. 2 (123). P. 277–282.

⁶ Influence of experimental bacterial preparations of diphtheria causative agent, obtained by physical factors, on adhesion of test strains *C. diphtheriae* / I.V. Yeliseyeva, Ye. M. Babich, V.I. Belozersky, L.A. Zhdamarova, S.A. Cap. *Bulletin of Biology and Medicine*. 2016. V. 4. T. 1 (133). P. 264–268.

процесу отримання поверхневих нативних структур, що у свою чергу знижуватиме токсичність і реактогенність імунобіологічних препаратів.

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

1. Мікробіологічні аспекти хронічних інфекцій верхніх дихальних шляхів стафілококового генезу

Для визначення ролі *S. aureus* у розвитку хронічних запальних захворювань верхніх дихальних шляхів (хронічний тонзиліт (далі – ХТ), хронічний риніт (далі – ХР), хронічний синусит (далі – ХС), носійство *S. aureus*) важливо було проаналізувати мікробіоценози пацієнтів на вищезазначені захворювання за концентрацією та видовим складом мікробіоти. Встановлено, що у хворих на вищевказану хронічну ЛОР-патологію переважна більшість асоціацій мікроорганізмів слизових оболонок мигдаликів складалась із 3–5 представників – (83±5,4)%, а слизових оболонок носа – із 2–3 представників (74±4,2)%. У хворих на ХТ, ХР і ХС *S. aureus* виділявся відповідно в (69,4±3,1)% та (63,6±2,9)% випадках, а у медичних працівників (носії) – у (30,3±1,1)%. Причому ступінь заселення золотистим стафілококом слизових оболонок зіву і носа хворих становила, відповідно, (6,8±0,4) Іg КУО/г та (6,1±0,4) Іg КУО/г проти (3,6±0,2) Іg КУО/г і (5,2±0,2) Іg КУО/г у носіїв. Оскільки пацієнтами були студенти, які перебувають на медичному обліку в КЗОЗ ХМСЛ з першого курсу і спостерігаються протягом усього терміну навчання (5–6 років), та медичний персонал (постійно) вказаної лікарні, в нас була можливість аналізувати результати обстежень упродовж усього часу дослідження. Моніторинг бактеріологічних досліджень хворих на ХТ, ХР, ХС та особливо носіїв серед медперсоналу показав наявність *S. aureus* в їхніх результатах аналізів протягом досить тривалого часу – 1,5–5 років, що вказує на резидентне носійство і сталі персистентні властивості клінічних ізолятів. *Lactobacillus spp.* виділялись у (31,8±3,1)% бактеріоносіїв.

Встановлено, що в разі загострення ХТ *S. aureus* займав друге місце як етіологічний агент (69,4±3,1)% хворих, а *Lactobacillus spp.*

виділялись лише у $(21,4 \pm 3,7)\%$ хворих. Зі слизових оболонок носа хворих на ХР і ХС, у стадії ремісії, найчастіше виділялись *Lactobacillus* spp., непатогенні представники роду *Neisseria*, *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, бактерії роду *Fusobacterium*, тоді як під час загострення процесу найчастіше виділявся *S. aureus* – $(63,6 \pm 2,9)\%$ хворих, а *Lactobacillus* spp. виділялись лише у $(6,4 \pm 2,1)\%$ хворих. Зі слизових оболонок носа практично здорових осіб найчастіше виділялись коагулазонегативні стафілококи, непатогенні нейсерії, непатогенні коринебактерії, аерококи та лактобацили.

Порівняльний аналіз мікробіоценозів показав низький популяційний рівень бактерій роду *Lactobacillus* за хронічних інфекцій ВДШ. Співвідношення *S. aureus/Lactobacillus* spp. на слизових оболонках було практично на одному рівні за ремісії і бактеріоносійства, тоді як під час загострення хронічних хвороб спостерігалось суттєве зниження популяції лактобацил.

Приведені вище дані дають можливість припущення, що зниження популяції *Lactobacillus* spp. на слизових носоглотки призводить до ослаблення місцевої ланки імунної системи, а це у свою чергу зумовлює або розвиток бактеріоносійства, або хронізацію запального процесу з тривалим порушенням гомеостазу макроорганізму. Тривале порушення гомеостазу тканин може призводити до зниження в них концентрацій кисню, що може впливати на біологічні властивості патогена.

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

Дослідження впливу умов зниженого парціального тиску кисню на колонізаційну здатність клінічних ізолятів *S. aureus* показало наявність лінійного прямо пропорційного зв'язку середньої сили між кількістю пересівів культур за мікроаерофільних умов вирощування та показниками СПА ($r = 0,76$) і слабкої сили між кратністю пасажів та ІАМ ($r = 0,59$). Найвищий індекс адгезивної активності мали штами, ізольовані зі слизових оболонок носа хворих та носіїв, відповідно $(6,39 \pm 0,36)$ та $(5,06 \pm 0,28)$. Після 8–10-ти пасажів в умовах мікроаерації цей показник збільшувався в середньому в 1,2 рази ($p < 0,05$). Таким чином, встановлено, що за умов мікроаерації відбувається стимуляція адгезивних властивостей клінічних ізолятів *S. aureus*, що може сприяти подальшій колонізації

цим патогеном слизових оболонки ВДШ. Вивчення ФП клінічних штамів *S. aureus* за аеробних умов культивування встановило, що лецитиназа виявлялась через 24 години у $(78,1 \pm 1,2)\%$ ізолятів від хворих та у $(85,2 \pm 1,6)\%$ ізолятів від носіїв. За умов мікроаерації лецитиназа виявлялась через 24 години у 100% ізолятів і не змінювалась протягом 10-ти пасажів.

Кількісне визначення активності екстрацелюлярної плазмокоагулази показало такі відмінності: за аеробних умов культивування $(89,0 \pm 1,8)\%$ ізолятів *S. aureus* мали плазмокоагулазну активність на рівні (120 ± 5) ум.од./мл, $(11,0 \pm 0,9)\%$ – на рівні (60 ± 5) ум.од./мл. За мікроаерофільних умов газового складу атмосфери інкубування зміна активності плазмокоагулази відбувалась після п'ятого пасажу – у $(32,1 \pm 1,1)\%$ штамів активність цього ферменту підвищувалась у 2 рази ($p < 0,05$), а у $(14,8 \pm 0,9)\%$ – у 4 рази ($p < 0,01$). Після 10-го пасажу за умов мікроаерації $(75,8 \pm 1,6)\%$ штамів золотистих стафілококів мали активність плазмокоагулази на рівні (480 ± 5) ум.од./мл, $(23,1 \pm 1,2)\%$ – на рівні (240 ± 5) ум.од./мл, $(1,1 \pm 0,3)\%$ – на рівні (120 ± 5) ум.од./мл. Кореляційний аналіз персистентного потенціалу (антикомплементарна й антилізоцимна активності) за різних умов газового складу атмосфери культивування виявив наявність лінійного прямо пропорційного зв'язку середньої сили між кількістю пересівів культур за мікроаерофільних умов вирощування та показниками АКА ($r = 0,74$) та АЛА ($r = 0,79$), що може вказувати на модифікаційні зміни факторів персистенції. Під час дослідження здатності золотистих стафілококів до біоплівкоутворення встановлено, що за аеробних умов культивування $(33,3 \pm 1,6)\%$ клінічних ізолятів проявляли слабку здатність до біоплівкоутворення, $(41,7 \pm 1,8)\%$ – характеризувалися середнім рівнем біоплівкоутворення, а $(25,0 \pm 1,5)\%$ – високим. Причому тільки $(11,8 \pm 0,9)\%$ і $(36,1 \pm 1,6)\%$ ізолятів зі слизових оболонки носа, відповідно, носіїв та хворих мали помірну та слабку ступінь утворення біоплівок. За умов мікроаерації вже після першого пасажу всі зазначені штами *S. aureus* мали високий рівень біоплівкоутворення.

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

2. Вплив різних умов оточуючого середовища на міжмікробні взаємовідносини

Між представниками мікробних спільнот утворюються не індивідуальні взаємовідносини, однією з форм яких в асоціаціях є мікробний антагонізм за рахунок продукування токсичних для інших видів речовин, у т.ч. бактеріальних токсинів.

З метою вивчення антагоністичних факторів, що можуть впливати на міжмікробні взаємовідносини і, таким чином, регулювати популяційний рівень асоціантів, було проведено низку дослідів відносно дії бактеріальних токсинів (екзо- та ендо-) на біологічні властивості окремих патобіонтів ВДШ. Для цих досліджень було використано натуральний дифтерійний токсин (далі – ДТ) як представник екзотоксинів бактерій та ліпополісахарид (далі – ЛПС) як представник ендотоксинів.

У дослідженні було взято нативний дифтерійний токсин промислового виробництва серій № 5 та № 001007, які було отримано з ПАТ «Біолікфармстандарт». ЛПС було отримано водно-фенольним методом із клінічного штаму *E. coli* 126. Як представники грамнегативних бактерій були взяті референс-штами *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та клінічний ізолят *K. pneumoniae*. Як представники грампозитивних бактерій були взяті референт-штами *S. aureus* ATCC 25923 та *E. faecalis* ATCC 6783.

Статистично достовірний стимулюючий ефект був отриманий під час вивчення ростових властивостей досліджуваних грамнегативних бактерій після додавання бактеріальних токсинів у дозі 0,1 мл на 1,0 мл поживного середовища, а пригнічуючий – у дозі 0,3 мл. Так, ендотоксин у дозі 0,1 мл на 1,0 мл поживного середовища стимулював через 18 годин накопичення біомаси порівняно з контролем *E. coli* ATCC 25922 в 1,67 рази ($p < 0,01$), *P. aeruginosa* ATCC 27853 – у 2,62 рази ($p < 0,01$) та *K. pneumoniae* – у 2,47 рази ($p < 0,01$). Екзотоксин у дозі 0,1 мг на 1,0 мл поживного середовища через 18 годин також стимулював накопичення біомаси кишкової палички в 1,53 рази ($p < 0,05$), синьогнійної палички – у 1,93 ($p < 0,01$) рази, клібсільозної культури – у 1,69 ($p < 0,01$) рази.

Під час дослідження впливу бактеріальних токсинів на грампозитивну мікрофлору встановлено достовірне зниження накопичення біомаси для *S. aureus* ATCC 25923. Так, ДТ у дозі 0,1 мл у середньому пригнічував показники кінетики росту зазначеного патобіонта у 22,5 ($p < 0,001$) рази, а в дозі 0,3 мл –

у 30 ($p < 0,001$) разів. Тоді як ліпополісахарид пригнічував показники кінетики росту *S. aureus* ATCC 25923 лише в 1,6 ($p < 0,05$) рази за дози 0,1 мл і у 2,0 ($p < 0,01$) рази – за дози 0,3 мл.

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

Оскільки здатність мікроорганізмів до колонізації еукаріотичних клітин зумовлює патогенез багатьох інфекційних захворювань, метою подальших досліджень стало вивчення показників адгезивного процесу, антикомплементарної здатності та антибіотикочутливості у тест-штамів, що підпали під вплив бактеріальних токсинів. Встановлено, що бактеріальні токсини в зазначених вище дозах достовірно не впливали на адгезивні властивості тест-бактерій, проте знижували в 1,3–1,5 ($p < 0,05$) рази їхню антикомплементарну активність.

На основі лактобацил існує багато фармацевтичних препаратів для відновлення біоценозів урогенітального і травного тракту, але практично відсутні препарати, спрямовані на відновлення мікрофлори верхніх дихальних шляхів. Наступним етапом роботи стало дослідження можливості застосування лактобацил, вилучених із різних еконіш, для відновлення біоценозів ВДШ. Для цього були взяті штами, ізольовані з пробіотичних препаратів, ротоглотки людей та кишечнику бджіл. Усі взяті в досліді пробіотичні культури відповідали основним вимогам єдиної системи оцінки пробіотиків та пробіотичних засобів (WHO Expert Committee on biological standardization. Geneva, 2004), а саме: були каталазонегативні, не продукували лецитиназу, не мали гемолізинів, продукували лізоцим, мали стійкість або помірну чутливість до представників основних груп антибіотиків. Тоді як серед ізолятів, вилучених від людей і бджіл, більша частина штамів не відповідала основним вимогам хоча б за однією ознакою (стійкість до антибіотиків). Ураховуючи вищезазначене, для подальших досліджень було відібрано 36 ізолятів (17 від людей, 12 від бджіл та 7 із пробіотиків). Первинну ідентифікацію лактобацил визначали за спектрами зброджування вуглеводів із використанням тест-системи API 50 CHL («bioMérieux», Франція).

Результати ідентифікації лактобацил за використання API 50 CHL показали, що більшість клінічно досліджених штамів відносились до *Lactobacillus plantarum* з ІД 99,8–99,9% подібності до видів, наявних у базі даних, та з Т (ступінь подібності тест-штаму до типового штаму виду) – 0,26–1. За комплексом біохімічних ознак штами лактобацил було згруповано у 14 фенотипових профілів. Позитивний вплив пробіотичних бактерій на організм людини зумовлений високими антагоністичними властивостями в біоценозі завдяки продукції антимікробних сполук. Тому було проведено оцінку антагоністичних властивостей штамів лактобацил. Встановлено, що за аеробних умов культивування як штамів-антагоністів, так і тест-культур, ізоляти *Lactobacillus* spp. подавляли розмноження ізолятів *S. aureus* у (66,6 ± 15,7)% випадків, *K. pneumoniae* – у (42,8 ± 12,9)%, *P. aeruginosa* – у (23,6 ± 8,9)%, *E. faecalis* – у (18,9 ± 9,6)%. Частота виявлення вказаної активності залежала від походження штамів-антагоністів. Так, штами, ізольовані від людей та бджіл, проявляли конкурентні властивості у (85,7 ± 13,2)% випадків, а пробіотичні штами, крім *L. rhamnosus* GG, практично не впливали на ріст тест-культур.

Під час культивування за мікроаерофільних умов як штамів-антагоністів, так і тест-культур, *Lactobacillus* spp. подавляли розмноження ізолятів *S. aureus* у (88,3 ± 11,6)% випадків, *K. pneumoniae* – у (53,2 ± 13,4)%, *P. aeruginosa* – у (22,8 ± 9,1)%, *E. faecalis* – у (43,6 ± 11,3)%. Тобто в атмосфері зниженого парціального тиску кисню та підвищеного вмісту вуглекислого газу штами лактобацил продукували більш активні речовини протикокової флори (*S. aureus* і *E. faecalis*).

З метою вивчення можливості застосування лактобацил для боротьби з мікроорганізмами, які викликають патологічні стани верхніх дихальних шляхів, було вивчено антагоністичну активність відібраних ізолятів проти таких патобіонтів ВДШ, як *C. diphtheriae* та *S. aureus*, що можуть спричиняти бактеріоносійство. Конкурентні властивості вивчали методом відстроченого антагонізму за спектром дії, тобто здатністю пригнічувати життєдіяльність різної кількості тест-культур та зазначенням зон затримки росту вищевказаних патобіонтів під час міжмікробної взаємодії.

За аеробних умов культивування як штамів-антагоністів, так і тест-культур 66,7% усіх досліджених лактобацил володіли здатністю пригнічувати розмноження ізолятів *C. diphtheriae*, але мали

недостатню здатність щодо пригнічення росту клінічних ізолятів *S. aureus*. За аеробних умов культивування більша кількість ізолятів *S. aureus* мали зони затримки росту на рівні 5–10 мм. Найбільшими антагоністами були такі штами: *L. rhamnosus* GG П – ізольований із пробіотичного (П) засобу, *L. casei* Л – ізольований від людини (Л) і *L. plantarum* Б – ізольований з кишечника бджіл (Б). За мікроаерофільних умов культивування питома вага чутливих штамів *S. aureus* до дії речовин, що продукуються лактобацилами, суттєво збільшувалась. Дослідження антагоністичних властивостей тест-штамів *Lactobacillus* spp. показало, що за мікроаерофільних умов культивування найбільш сильним антагоністом стосовно ізолятів *C. diphtheriae* та *S. aureus* виявився штам *L. plantarum* Б, вилучений із кишечника бджіл. Саме його і було відібрано як штам-кандидат. Також досить високими антагоністичними властивостями проти патобіонтів ВДШ володіли ще два штами: *L. rhamnosus* GG П (пробіотичні) та *L. casei* Л (від людей). Зазначені штами були відібрані як потенційні штами-кандидати.

Оскільки використання фенотипових ознак не дає змоги чітко визначити видову ідентифікацію лактобацил, нами було проведено видову та внутрішньовидову молекулярно-генетичну ідентифікацію відібраних ізолятів *Lactobacillus* spp. з використанням RAPD-ПЛР. За результатами всі досліджені ізоляти були віднесені до бактерій роду *Lactobacillus*. Внутрішньовидову ідентифікацію проводили з використанням видоспецифічних праймерів plant R та plant F. Позитивний результат (300 п. н.) було отримано для 34-х штамів, що підтвердило їх належність до виду *L. plantarum*, у т. ч. і для штаму, вилученого з кишечника бджіл. Таким чином, згідно з молекулярно-генетичною ідентифікацією авторський штам віднесено до *Lactobacillus plantarum*. Для подальшого вивчення можливості застосування штамів лактобацил як потенційних пробіотичних штамів-кандидатів було розроблено метод визначення катаболічної активності мікроорганізмів та вивчено найбільш важливі біологічні (катаболічні, ростові, адгезивні, антагоністичні) властивості лактобацил за аеробних і мікроаерофільних умов культивування.

У ході проведених досліджень встановлено, що за мікроаерофільних умов підвищувалась кількість спожитої лактобацилами глюкози в середньому в 1,3 ($p < 0,05$) рази порівняно з аеробними умовами. Зміни показників ростових процесів усіх досліджених

штамів мали спільні тенденції. Динаміка зростання всіх досліджених лактобацил за умов мікроаерації була вищою в порівнянні з аеробними умовами культивування. Найбільші відмінності в показниках за аеробних та мікроаерофільних умов газового складу атмосфери інкубації були відзначені для штамів *L. rhamnosus* GG П, *L. casei* Л та *L. plantarum* Б. Одержані дані дозволяють зробити висновок, що газові умови культивування впливають на динаміку росту *Lactobacillus* spp. Отримані дані можуть бути використані в промисловості для стимуляції накопичення біомаси промислових штамів.

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

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

Показники адгезивної активності всіх *Lactobacillus* spp. за мікроаерофільних умов культивування підвищувались: СПА в середньому в 1,2–1,3 ($p < 0,05$) рази, КА – у середньому в 1,2 ($p < 0,05$) рази.

Позитивний вплив пробіотичних бактерій на організм людини зумовлений не тільки їхньою високою здатністю до цитоадгезії та колонізації, а й високими антагоністичними властивостями в біоценозі завдяки продукції антимікробних сполук. У попередніх дослідях було встановлено, що конкурентні властивості *L. rhamnosus* GG П і *L. casei* Л виявилися достовірно нижчими в 10,8–16,5 ($p < 0,001$) рази за відповідні показники штаму *L. plantarum* Б, вилученого з кишечника бджіл. Тому наступною ланкою досліджень було вивчення впливу умов мікроаерації на антагоністичні властивості штаму *L. plantarum* Б проти таких патогенів, як *S. diphtheriae* та *S. aureus*, що досить часто колонізують слизові оболонки верхніх дихальних шляхів, при цьому інфекційний процес проявляється переважно у вигляді бактеріоносійства. З'ясовано, що за мікроаерофільних умов культивування відбувалось достовірне підвищення антагоністичної активності *L. plantarum* Б порівняно з аеробними умовами культивування. Проведена фізіолого-біохімічна та молекулярно-генетична ідентифікація виділених з різних еконіш *Lactobacillus* spp. надала змогу

визначити їхні антагоністичні властивості відносно певних патобіонтів ВДШ, ідентифікувати і депонувати авторський штам колективу в Українську колекцію мікроорганізмів як можливий вітчизняний пробіотичний штам-кандидат.

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

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

Встановлено, що метаболіти *Lactobacillus* spp., отримані за умов зниженого парціального тиску кисню, мали достовірно більшу інгібуючу здатність – у 1,2–3,9 рази ($p < 0,05$) щодо ростових властивостей тест-культур *S. aureus*. Так, метаболіти *L. rhamnosus* GG П у дозі 0,1 мг/мл достовірно пригнічували ріст стафілококів і за аеробних, і за мікроаерофільних умов культивування *S. Aureus*, відповідно, в середньому в 1,2 ($p < 0,05$) та 1,4 ($p < 0,05$) рази, а в дозі 0,3 мг/мл – у 1,4 ($p < 0,05$) і 1,8 ($p < 0,05$) рази відповідно. Метаболіти *L. casei* Л у дозі 0,1 мг/мл пригнічували розвиток стафілококів і за аеробних, і за мікроаерофільних умов культивування, відповідно, в 1,2 ($p < 0,05$) та 1,5 ($p < 0,05$) рази, а в дозі 0,3 мг/мл – у 1,3 ($p < 0,05$) та 1,6 ($p < 0,05$) рази відповідно. Метаболіти *L. plantarum* Б за аеробних і мікроаерофільних умов культивування в дозі 0,1 мг/мл пригнічували ріст *S. aureus* відповідно в 1,4 ($p < 0,05$) та 2,0 ($p < 0,01$) рази, а за збільшення дози до 0,3 мг/мл пригнічували ріст

стафілококів, відповідно, в 2,3 ($p < 0,01$) та 3,7 ($p < 0,01$) рази. Додавання метаболітів *Lactobacillus* spp. до поживного середовища під час вивчення їхнього впливу на лецитиназну активність *S. aureus* встановило, що за дози 0,1 мг/мл від $8,1 \pm 3,4\%$ до $48,6 \pm 2,6\%$ тест-штамів *S. aureus* втрачали лецитиназну активність через 3–5 пасажів на ньому, тоді як за дози 0,3 мг/мл від $22,9 \pm 3,4\%$ до $81,2 \pm 2,9\%$ тест-штамів *S. aureus* втрачали лецитиназну активність уже після першого пасажу.

Аналогічні результати були отримані й під час вивчення плазмокоагулязної активності золотистих стафілококів. П'ятикратне культивування на середовищах, що містили метаболіти, пригнічувало активність плазмокоагулази до (15 ± 5) ум.од/мл у 84,8–97,6% клінічних штамів золотистих стафілококів, десятикратне – призвело до припинення росту на щільних середовищах всіх взятих у досліді штамів *S. aureus*. Дослідження впливу метаболітів *Lactobacillus* spp. на біоплівкоутворення тест-культур *S. aureus* показало прямо пропорційну залежність здатності *S. aureus* до утворення біоплівок від концентрації метаболітів у середовищі. Доза метаболітів *Lactobacillus* spp. 0,1 мг/мл призводила до зниження штамів із високим ступенем активності в середньому в 1,2 рази ($p < 0,05$), а доза 0,3 мг/мл – у 19,4 рази ($p < 0,01$). Порівняння між властивостями метаболітів, отриманих від різних штамів *Lactobacillus* spp., щодо їх здатності до пригнічення росту, продукування ферментів патогенності та біоплівкоутворення у *S. aureus* дозволило встановити, що штам, ізолюваний з кишечника бджіл (*L. plantarum* Б), продукував метаболіти з більш високими показниками інактивації вищезазначених властивостей *S. aureus* та практично не інгібував клінічні ізоляти *Lactobacillus* spp. людини (як представники нормофлори). Згідно з рекомендаціями ВООЗ штами, що визначаються з метою подальшого застосування у виробництві, не повинні пригнічувати нормофлору хазяїна. Вивчення впливу метаболітів найактивнішого штаму *L. plantarum* Б на здатність до біоплівкоутворення клінічних ізолятів *Lactobacillus* spp. ($n=7$) не показало достовірної різниці. Усі взяті в досліді клінічні ізоляти *Lactobacillus* spp. мали середню ступінь біоплівкоутворення.

Вивчення впливу метаболітів *Lactobacillus* spp. на функціонально-метаболічну активність фагоцитів установило достовірне стимулювання фагоцитарної активності нейтрофілів у середньому в 1,2 рази ($p < 0,05$) та підвищення їхнього окисного потенціалу в 1,2–2,0 рази

($p < 0,05$). З'ясовано, що реакція фагоцитів не залежала від газових умов отримання та дози взятих в експерименті метаболітів.

Ми припустили, що така висока біологічна активність отриманих метаболітів може бути зумовлена сполуками білкового походження (мікробні пептиди). У зв'язку з цим нами було вивчено білковий фракційний склад поживного середовища, на якому отримували метаболіти та метаболіти лактобацил (*L. rhamnosus* GG П, *L. casei* Л і *L. plantarum* Б), отриманих за різних умов газового складу атмосфери їх культивування (аеробні та мікроаерофільні). Під час аналізу результатів гель-фільтраційної хроматографії було встановлено наявність великої кількості однозарядних компонентів білкової низькомолекулярної матриці (маса/заряд 300–900), що входили до складу поживного середовища. У всіх досліджених метаболітах лактобацил, окрім низькомолекулярних пептидів, були виявлені пептиди з відносно високою молекулярною вагою (м.в.) – 1195–7670 Да. Оскільки за даними з наукової літератури молекулярна вага бактеріоцинів лактобацил знаходиться в межах 2–6 кДа, пептиди з м.в. ≥ 12 кДа не відбирались.

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

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

3. Теоретичне й експериментальне обґрунтування нових підходів до корекції мікробіоценозів верхніх дихальних шляхів

Наступним етапом стало отримання поверхневих антигенів *S. aureus*, для чого попередньо проводили модуляцію адгезивних властивостей за авторською методикою. Тест-культуру *S. aureus*

АТСС 25923 попередньо опромінювали хвилями міліметрового частотного діапазону 61,0 ГГц протягом 8-ми годин, а потім обробляли ультразвуком за допомогою приладів ГЗ-109 (60 кГц) та УЗДН-2Т (44 кГц) і вимірювали вміст білка.

Встановлено, що попередня обробка суспензії *S. aureus* АТСС 25923 підвищувала вміст білка в зразках у 1,5–1,9 разів ($p < 0,01$).

Вивчення біохімічного складу зразків установило, що в зразках, отриманих за допомогою приладу УЗДН, переважали такі амінокислоти: аргінін, лізин, валін та гліцин. Тоді як у зразках, отриманих за допомогою приладу ГЗ-109, переважали аргінін, лізин, валін, аланін та гліцин.

У грампозитивних бактерій до складу клітинних стінок входять тейхоеві кислоти (ТК), які пов'язують зі здатністю цих бактерій до адгезії і біоплівкоутворення. На цей час ТК викликають інтерес не тільки як фактори патогенності, але і як агенти, здатні викликати імунну відповідь. Саме тому наступним етапом стало визначення вмісту ліпотейхоевої і **рибіттейхоевої** кислот в отриманих нами зразках. Встановлено, що вміст ліпотейхоевої кислоти перевищував вміст рибіттейхоевої в середньому в 16,7 разів у зразках, отриманих за допомогою приладу УЗДН, та у 28,5 разів у зразках, отриманих за допомогою приладу ГЗ-109. Оскільки ліпотейхоева кислота ковалентно пов'язана із вбудованим у клітинну мембрану ліпідом, який діє як регулятор мурамідази та є лігандом для TLR2, що активує систему вродженого імунітету, отримані дані опосередковано свідчать про те, що в експериментальних зразках містяться нативні бактеріальні антигени, спроможні викликати імунну відповідь.

Наступною ланкою стало вивчення *in vitro* антиадгезивної властивості експериментальних зразків. Оскільки найкращі показники було отримано під час застосування приладу ГЗ-109, то для подальших досліджень були взяті тільки ці зразки. Всі отримані антигенні (Ag) зразки володіли антиадгезивною активністю по відношенню до *S. aureus*, причому зразок Ag5 проявляв більш виражену антиадгезивну активність. Саме його і було взято як нативний поверхневий мікробний антиген з антиадгезивною активністю для мукозальної кандидат-вакцини.

Експериментальні зразки (БС, БА) було перевірено на нешкідливість і алергенність у тестах на лабораторних тваринах. Під час вивчення нешкідливості безпородним мишам вводили зразки в об'ємі 0,5 мл перорально за допомогою насадки до шприцу. Спостереження

за тваринами протягом п'яти діб показало нешкідливість зразків, що досліджувались. Усі тварини були активними, а приріст маси їхнього тіла наприкінці спостережень збільшувався в середньому на 13% ($p \leq 0,05$). Дослідження зразків на гостру токсичність проводили на щурах вагою 250 ± 50 г декількома способами (внутрішньовенно, внутрішньочеревно, перорально) з використанням максимальної дози (2000 мг/кг). Результати показали відсутність клінічних симптомів інтоксикації тварин (порушення координації руху, наявність судом, стан волосяного і шкірного покриву, забарвлення слизових оболонок, положення хвоста тощо). Всі тварини протягом терміну спостереження (7 діб) набирали вагу. Приріст маси їхнього тіла збільшувався в середньому на 10–14% ($p \leq 0,05$) залежно від способу перевірки та дози зразку. Для вивчення дермонекротичних властивостей різні концентрації досліджуваних зразків вводили мурчакам внутрішньошкірно (гудзик) щодня, протягом 4 діб відзначали появу набряку, почервоніння, наявність некрозу або їх відсутність. За отриманими результатами експериментальні зразки не мали дермонекротичної активності. Дослідження алергенності зразків було проведено в кон'юнктивальному тесті. Швидку реакцію враховували через 15 хв., а для визначення гіперчутливості реакцію уповільненого типу враховували через 24 та 48 годин. Отримано негативну реакцію в кон'юнктивальному тесті – у тварин спостерігали відсутність почервоніння слізної протоки, склери та всієї кон'юнктиви. Таким чином, за результатами тестів установлено безпечність експериментальних зразків.

Для експериментального визначення можливості застосування представників роду *Lactobacillus* та кандидат-вакцини на основі нативних поверхневих мікробних антигенів для лікування/ санації хворих на хронічну ЛОР-патологію стафілококового генезу було розроблено відтворювальні лабораторні моделі хронічного стафілококового тонзиліту та хронічного назального носійства стафілококового генезу в кролів. За об'єкт були взяті кролі породи «Шиншила» вагою 2,0–2,5 кг. Всі тварини попередньо були обстежені на носійство *S. aureus*. Доза для інфікування та кратність введення підбирались експериментальним шляхом таким чином, щоб забезпечити у кролів нульовий показник летальності та відсутність септичного стану за мінімальної кількості тварин. У моделюванні ХТ такі показники досягнуті за попередньої підшкірної однократної сенсibiliзації кролів 0,1 мл зависі вбитих нагріванням (1 година при 80°C) клітин штаму *S. aureus* 209 P (ATCC 6538-P) щільністю 3,0 од. за шкалою

McFarland та двократним інфікуванням (інтервал 10 діб) 0,1 мл зависі добової культури *S. aureus* 209 P (ATCC 6538-P) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland. Під час моделювання хронічного назального носійства стафілококового генезу кролів двічі, з інтервалом у 2 доби, підшкірно сенсibiliзували 0,1 мл зависі вбитих нагріванням протягом 60 хвилин при 80°С клітин штаму *S. aureus* 209P (ATCC 6538-P) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland. Для індукування катарального риніту проводили попереднє подразнення слизової оболонки порожнини носа 0,1% розчином декстрану (C₆H₁₀O₅) Mr~70 000 у фізіологічному розчині з розрахунку 30 мкл у кожний носовий хід з наступним, через добу, інтраназальним інфікуванням кролів стандартизованою (3 од. щільності за шкалою McFarland) зависсю живих добових клітин референс-штаму. Інфікування проводили тричі – другий і третій раз, відповідно, через 7 та 14 діб у кількості 0,1 мл дозою 3,0 од. щільності за шкалою McFarland.

Під час дослідження можливості застосування представників роду *Lactobacillus* для підвищення резистентності слизових оболонок ротоглотки лабораторних тварин у моделюванні ХТ стафілококового генезу встановлено, що ступінь заселення слизових оболонок зіву інтактних кролів *Lactobacillus* spp. становив 5,3 ± 0,4 lg КУО/г, рівень лізоциму – 18,3 ± 3,8 мкг/мл, sIgA – 2,41 ± 0,6 мг/мл. Індекс імунної напруги (ІН) слизових оболонок зіву і носа тварин у середньому становив 0,41 ± 0,7. Після моделювання хронічного тонзиліту стафілококового генезу ступінь заселення слизових оболонок тварин *S. aureus* становив у середньому 5,2 ± 0,6 lg КУО/г, *Lactobacillus* spp. – 2,2 ± 0,8 lg КУО/г, рівень лізоциму – 4,3 ± 0,2 мкг/мл, sIgA – 1,23 ± 0,1 мг/мл, а ІН становив 0,15 ± 0,04. Тобто під час моделювання ХТ відбувається зниження ступеню заселення лактобацилами слизових оболонок тварин і вмісту в них лізоциму та sIgA, що вказує на зниження протиінфекційної резистентності слизових оболонок тварин.

Лабораторним тваринам проводили санацію зіву або 4% водним розчином еритроміцину (n=6), або суспензією лактобацил із концентрацією 9,0 ± 0,1 lg КУО/мл (n=6), зрошуючи поверхню зіву тричі на день протягом 10 діб.

Дослідження ступеню заселення стафілококом слизових оболонок зіву показало, що після санації еритроміцином у 50% кролів *S. aureus* висівався в кількості 1,8 ± 0,9 lg КУО/г, тоді як у групах тварин, яким було проведено санацію лактобацилами, *S. aureus* не висівався. У всіх

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

Можливість застосування представників роду *Lactobacillus* та кандидат-вакцини на основі мікробних поверхневих антигенів для санації/лікування носіїв *S. aureus* було досліджено на лабораторній моделі хронічного риніту стафілококового генезу. У тварин до і після моделювання ХР були визначені рівні лізоциму, sIgA та популяційний рівень лактобацил і золотистого стафілокока. Після моделювання ХР стафілококового генезу у тварин у середньому знижувався популяційний рівень *Lactobacillus* spp. у 3,4 рази ($p < 0,01$), рівень лізоциму – у 3,9 рази ($p < 0,01$), рівень sIgA – у 1,8 рази ($p < 0,05$).

Лабораторні тварини після мікробіологічного підтвердження розвитку ХР стафілококового генезу були розподілені на такі групи: I група (n=5) кролів, яким протягом 14 днів тричі на добу проводили санацію носа 4%-им водним розчином еритроміцину (АБ); II група (n=5) кролів, яким протягом 14 днів тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл БА *S. aureus* (Ag5); III група (n=5) кролів, яким протягом 14 днів тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл суспензії, що складалась із клітин лактобацил (Lac) на фізіологічному розчині (оптична щільність – 3 одиниці за шкалою McFarland); IV група (n=5) кролів, яким протягом 14 днів тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл композиції, що складалась із клітин лактобацил на фізіологічному розчині (оптична щільність – 3 одиниці за шкалою McFarland) і БА *S. aureus* у співвідношенні 1:1 (5Ag+Lac); V група (n=3) кролів – контроль носійства – протягом 14 днів тваринам тричі на добу обробляли ніс 0,1 мл фізіологічного розчину (К); VI група – інтактні тварини (I, n=3). Через 1, 7, 14 і 30 днів проводили обстеження тварин з визначенням популяційного рівня *S. aureus* і *Lactobacillus* spp. на слизовій носа, а також показників місцевого імунітету – лізоциму та sIgA

Встановлено, що санація кролів антибіотиком не призводила до повної ерадикації стафілокока. Обстеження тварин цієї підгрупи через 1, 7, 14 і 30 днів після санації встановило, що *S. aureus* висівався з носових ходів усіх тварин у кількості 0,6–4,5 lg КУО/г. Це достовірно нижче в середньому у 2,4 рази ($p < 0,05$) в порівнянні

з контрольною групою. Отримані результати можуть бути пов'язані з персистенцією збудника в більш глибоких шарах слизової оболонки носових ходів і подальшим його розвитком у зв'язку з відсутністю агента негативного впливу (антибіотика). Популяційний рівень *Lactobacillus* spp. на слизовій носа у кролів даної групи достовірно не відрізнявся від аналогічних показників контрольної групи і становив 1,2–0,3 lg КУО/г. Рівень лізоциму становив 5,7–12,1 мкг/мл, а рівень sIgA – 0,9–2,4 мг/мл, що вказує на загальне зниження протиінфекційної резистентності слизових оболонок носа. Однак показники резистентності слизових оболонок (лізоцим і sIgA) у середньому були вище, відповідно, у 2,0 ($p < 0,05$) і 1,1 рази ($p \leq 0,05$) в порівнянні з контрольною групою.

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

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

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

Обробка носових порожнин кролів композицією, що складалась з БА і суспензії лактобацил (*Lac*) у співвідношенні 1:1 призводила до повної ерадикації *S. aureus*. Обстеження слизової оболонки носа тварин цієї групи вже через 7 днів показало присутність незначної кількості *S. aureus* – 0–0,3 lg КУО/ г. Через 14 і 30 днів після обробки даною композицією *S. aureus* не виділявся. У тварин цієї групи на 30-ту добу популяційний рівень *Lactobacillus* spp. на слизовій носі збільшувався у 2,1 рази ($p < 0,05$), рівень лізоциму – у 2,3 рази ($p < 0,01$), рівень sIgA – у 1,4 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з першою добою.

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

ВИСНОВКИ

У роботі наведено теоретичне узагальнення й експериментальне обґрунтування вирішення актуальної наукової і практичної проблеми – удосконалення методів профілактики стафілококового бактеріоносійства та перешкоджання персистенції стафілококів на слизових оболонках ВДШ шляхом розроблення підходів до створення імунобіологічних препаратів нового покоління на основі нативних поверхневих мікробних антигенів і пробіотиків. На основі отриманих даних була визначена можливість корекції мікробіоценозів носової порожнини за допомогою *Lactobacillus* spp. та поверхневих мікробних антигенів.

АНОТАЦІЯ

Нозокоміальні інфекції стафілококового генезу відіграють провідну роль у виникненні ускладнень під час тривалого перебування хворих у лікувальних закладах. Для попередження/лікування гнійно-запальних захворювань, викликаних *Staphylococcus aureus*, застосовують антибіотики або імунобіологічні препарати ХХ сторіччя. Сьогодні стратегія ВООЗ щодо антимікробної терапії направлена на розроблення імунобіологічних препаратів нового покоління. До таких препаратів можуть бути віднесені проти-стафілококові засоби на основі поверхневих антигенів бактерій та представників нормофлори людини. Нами були проведені дослідження отриманих експериментальних зразків, які містили поверхневі антигени *S. aureus* та клітини *Lactobacillus* spp. або їх метаболіти. В експериментах на лабораторних тваринах визначена ефективність отриманих зразків: назальна обробка кролів, у яких було штучно відтворено хронічний стафілококовий риніт, отриманими зразками призводила до ерадикації *S. aureus*, відновлення нормофлори та протиінфекційної резистентності слизових оболонок носа тварин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kalinichenko S.V. Modern aspects of development of anti-staphylococcal drugs of a new generation based on *S. aureus* adhesins and probiotic strains of Lactobacilli. *Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine* : Collective monograph. Riga : Izdevnieciba «Baltija Publishing». 2020. 344 p. P. 175–192. DOI: 10.30525/978-9934-588-64-8-10.
2. The use bacterial lysates in the complex treatment of patients with chronic decompensated tonsillitis. *Annals of Mechnikov's Institute* / Н. Манеє et al. 2017. № 4. P. 46–52. DOI: 10.5281/zenodo.1133777.
3. Імунологічні показники у хворих на хронічний тонзиліт при лікуванні традиційними методами та з застосуванням високоенергетичного лазера. *Вісник проблем біології і медицини* / Х. Ман та ін. 2018. Вип. 1 Т. 1 (142). С. 209–212. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-209-212.
4. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children (A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials). *Medicine (Baltimore)* / Yizhong Wang et al. 2016 Aug. № 95 (31). P. e4509. DOI: 10.1097/MD.0000000000004509.

5. Study of the effect of diphtheria bacterial antigenic preparation obtained by means of electromagnetic radiation of extremely high frequency, on the formation of humoral antitoxic immunity and colonization resistance in experimental animals. *Bulletin of Biology and Medicine* / I.V. Yeliseyeva et al. 2015. Issue 3. T. 2 (123). P. 277–282.

6. Influence of experimental bacterial preparations of diphtheria causative agent, obtained by physical factors, on adhesion of test strains *C. Diphtheriae*. *Bulletin of Biology and Medicine* / IV Yeliseyeva et al. 2016. V. 4. T. 1 (133). P. 264–268.

Information about the authors:

Kalinichenko S. V.,

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher,

Head of the Laboratory of Viral Infections

I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the

National Academy of Medical Sciences of Ukraine

14/16 Pushkinska str., Kharkiv, 61057, Ukraine

Dubinina N. V.,

Candidate of Medical Sciences,

Associate Professor at the Department of Microbiology,

Virology and Immunology

National University of Pharmacy

53, Pushkinska str., Kharkiv, 61057, Ukraine