

Комбінований вплив метаболітного комплексу *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* та амікацину на інфіковані рани в моделях *in vivo*

О. Ю. Ісаєнко*^{1,A,C,D}, В. В. Мінухін^{ID}^{1,F}, Т. М. Рижкова^{ID}^{2,B,E}, О. В. Коцар^{ID}^{3,B}

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків, ²Харківська державна зооветеринарна академія, Україна, ³Харківський національний медичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – на моделі ран шкіри мурчаків, інфікованих полірезистентним штамом *Pseudomonas aeruginosa*, вивчити *in vivo* ефективність одночасного та послідовного застосування метаболітного комплексу *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* з антибактеріальним препаратом для обґрунтування перспективності його використання для розроблення «препаратів супроводження» до антибіотиків.

Матеріали та методи. Метаболітний комплекс лактобактерій і сахароміцетів отримали культивуванням клітин пробіотичних мікроорганізмів у власних ультразвукових дезінтегратах (MLS). На інфіковані полірезистентним штамом *P. aeruginosa* рани щоденно двічі на добу наносили 0,9 % розчин натрію хлориду (контрольна група, К), амікацин – АБ (група Л I), АБ одночасно з MLS (група Л II), АБ по чергово з MLS (група Л III). Динаміку планіметричних показників ран (визначення розмірів, розрахунок площі загоєння, швидкості загоєння, коефіцієнта швидкості загоєння, репаративного ефекту) оцінювали на 1, 5, 8 і 11 добу. Протимікробну активність оцінювали за бактеріологічним дослідженням матеріалу зі зразків ран з ідентифікацією та визначенням кількості колонійутворювальних одиниць (КУО) збудника.

Результати. Встановлена комбінована протипсевдомонадна активність амікацину та метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*. Зниження КУО *P. aeruginosa* й прискорення репаративних процесів ран спостерігали у групах Л I, Л II, Л III щодо К на 5 і 8 добу ($p < 0,05$). Доведена більша ефективність запропонованого послідовного способу застосування АБ і MLS, ніж одночасного. Площі поверхонь ран у групі Л III були меншими щодо Л II (в 1,8 і 5,0 раза, $p = 0,03$), Л I (у 2,8 і 9,0 раза, $p = 0,04$) на 5 і 8 добу відповідно. Підвищення синергічної протимікробної активності завдяки новому підходу послідовного впливу зумовлене, ймовірно, збільшенням чутливості тест-культур до антибіотиків.

Висновки. Наведені результати дослідження щодо вираженого синергічного ефекту в разі комбінованого застосування АБ і MLS доводять його перспективність для практичної медицини та фармацевтичної промисловості, а також дають можливість створення на основі метаболітних комплексів «препаратів супроводження» до антибіотиків для лікування інфікованих ран.

Ключові слова:

метаболіти, антибіотики, полірезистентні бактерії, інфіковані рани, синергічна активність.

Запорізький медичний журнал. 2020. Т. 22, № 6(123). С. 791-798

*E-mail: el_isaenko@ukr.net

The combined influence of a metabolite complex of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* with amikacin on infected wounds in models *in vivo*

O. Yu. Isaenko, V. V. Minukhin, T. M. Ryzhkova, O. V. Kotsar

The aim of the work – to study *in vivo* the effectiveness of the simultaneous and alternate use of the *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* metabolite complex with an antibacterial preparation in a guinea pig model of skin wound infected with a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain to validate prospects for its application in the development of add-on preparations to antibiotic therapy.

Materials and methods. The metabolite complex of lactobacteria and saccharomycetes was obtained by culturing cells of probiotic microorganisms in their own ultrasonic disintegrates (MLS). The following were applied to wounds infected with the multiresistant strain of *P. aeruginosa* twice daily: 0.9 % sodium chloride solution (control group, K), amikacin – AB (group L I), simultaneously AB with MLS (group L II), alternately AB and MLS (group L III). The dynamics of planimetric indicators of wounds (sizing, calculation of the healing area, healing rate, healing rate coefficient, reparative effect) was carried out on days 1, 5, 8 and 11. Antimicrobial activity was evaluated by bacteriological examination of a material from wound samples with identification and determination of the number of colony forming units (CFU) of the pathogen.

Results. The combined anti-pseudomonas activity of amikacin and the *L. rhamnosus* GG and *S. boulardii* metabolite complex was established. Decreased CFU of *P. aeruginosa* and acceleration of reparative processes in wounds were observed in groups L I, L II, L III compared to K on days 5 and 8 ($P < 0.05$). The greater effectiveness of the first proposed alternate method of using AB and MLS was proved in contrast with their simultaneous application. The wound surface areas in L III group were smaller relative to L II (1.8 and 5.0 times, $P = 0.03$), and L I (2.8 and 9.0 times, $P = 0.04$) on days 5 and 8, respectively. The increase in synergistic antimicrobial activity due to the new approach of alternate effect was probably due to an increase in antibiotic susceptibility of the test cultures.

Conclusions. The presented in the work results of the pronounced synergistic effect of combined using amikacin and the metabolite complex of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* confirm its promise for practical medicine and the pharmaceutical industry. The data obtained open the potential for developing add-on preparations to antibiotic therapy based on metabolite complexes for the treatment of infected wounds.

Key words:

metabolites, antibiotics, multiresistant bacteria, infected wounds, synergistic activity.

Zaporozhye medical journal 2020; 22 (6), 791-798

Ключевые слова: метаболиты, антибиотики, полирезистентные бактерии, инфицированные раны, синергическая активность.

Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, № 6(123). С. 791-798

Комбинированное воздействие метаболитного комплекса *Lactobacillus rhamnosus GG* и *Saccharomyces boulardii* и амикацина на инфицированные раны в моделях *in vivo*

О. Ю. Исаенко, В. В. Минухин, Т. Н. Рыжкова, Е. В. Коцарь

Цель работы – на модели ран кожи морских свинок, инфицированных полирезистентным штаммом *Pseudomonas aeruginosa*, изучить *in vivo* эффективность одновременного и последовательного применения метаболитного комплекса *Lactobacillus rhamnosus GG* и *Saccharomyces boulardii* с антибактериальным препаратом для обоснования перспективности его использования для разработки «препаратов сопровождения» к антибиотикам.

Материалы и методы. Метаболитный комплекс лактобактерий и сахаромикетов получен культивированием клеток пробиотических микроорганизмов в собственных ультразвуковых дезинтегратах (MLS). Ежедневно дважды на инфицированные полирезистентным штаммом *P. aeruginosa* раны наносили 0,9 % раствор натрия хлорида (контрольная группа, К), амикацин – АБ (группа Л I), АБ одновременно с MLS (группа Л II), АБ поочередно с MLS (группа Л III). Динамику планиметрических показателей ран (определение размеров, расчет площади заживления, скорости заживления, коэффициента скорости заживления, репаративного эффекта) оценивали на 1, 5, 8 и 11 сутки. Противомикробную активность оценивали по бактериологическому исследованию материала с образцов ран с идентификацией и определением количества колониобразующих единиц (КОЕ) возбудителя.

Результаты. Установлена комбинированная противопсевдомонадная активность амикацина и метаболитного комплекса *L. rhamnosus GG* и *S. boulardii*. Снижение КОЕ *P. aeruginosa* и ускорение репаративных процессов ран наблюдали в группах Л I, Л II, Л III относительно К на 5 и 8 сутки ($p < 0,05$). Доказана большая эффективность предложенного последовательного способа применения АБ и MLS, чем одномоментного. Площади поверхностей ран в группе Л III были меньше относительно Л II (в 1,8 и 5,0 раза, $p = 0,03$), Л I (в 2,8 и 9,0 раза, $p = 0,04$) на 5 и 8 сутки соответственно. Повышение синергической противомикробной активности благодаря новому подходу последовательного воздействия обусловлено, вероятно, увеличением чувствительности тест-культур к антибиотикам.

Выводы. Представленные результаты исследования о выраженном синергическом эффекте при комбинированном применении АБ и MLS доказывают его перспективность для практической медицины и фармацевтической промышленности, а также открывают возможность создания на основе метаболитных комплексов «препаратов сопровождения» к антибиотикам для лечения инфицированных ран.

За списком пріоритетних збудників захворювань для досліджень зі створення нових антибактеріальних препаратів, що опублікований ВООЗ, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) належить до першої категорії пріоритетності – критично високий рівень [1]. Спостерігають збільшення частоти виявлення неферментувальних грамнегативних бактерій, як-от *P. aeruginosa*, з інфекційних ран [2]. Ускладнення ран у разі виникнення хірургічних інфекцій у 75 % випадків супроводжується зміною видового складу позаликарняної мікрофлори збудниками нозокоміальних інфекцій. У цих випадках спостерігають зменшення грампозитивних і збільшення грамнегативних мікроорганізмів. Зміни/чергування збудників здебільшого відбуваються так: *Streptococcus spp.* → *Staphylococcus spp.* → *Enterobacteriaceae spp.* → *Pseudomonas spp.* [3]. Особливу небезпечність становлять інфекційні рани, викликані полірезистентними до антибіотиків мікроорганізмами [4]. Ця світова проблема, що набирає актуальності, спонукає дослідників до розроблення нових препаратів та удосконалення наявних антибактеріальних засобів. Це можливо завдяки застосуванню компонентів мікробних клітин пробіотиків та їхніх метаболітів.

Високий рівень протимікробної активності продуктів життєдіяльності мікроорганізмів доведено завдяки пригніченню зростання *Bacillus brevis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Acinetobacter spp.* і *Arthrobacter spp.* тощо [5–10, 13, 15, 17, 18]. Збільшення продукування метаболітів *L. rhamnosus* досягнуто додаванням до бульйону MRS 0,1 % дріжджового екстракту або комбінованим культивуванням *Kluyveromyces lactis* 412, *Kl. marxianus* 86, *Kl. marxianus* 11, *Candida sp.* 151

з *L. rhamnosus* 2012 (аеробні умови, 37 °С, 48 годин) [5]. Продукти життєдіяльності *L. rhamnosus* інгібували 44 % *Staphylococcus aureus*, а при отриманні метаболітів лактобактерій спільно з грибами спостерігали збільшення їхньої протистафілокової активності до 75 %. У попередніх роботах встановили підвищення протимікробної активності метаболітного комплексу завдяки спільному культивуванню мікробних клітин *L. rhamnosus GG* і *S. boulardii* в ультразвуковому дезинтеграті лактобактерій (MLS) [6,7].

Синергичний протимікробний ефект пробіотиків та їхніх продуктів життєдіяльності з антибактеріальними препаратами щодо етіологічно значущих мікроорганізмів встановили в тестах *in vitro* [7–9,18]. Комбінованим випробуванням MLS з антибактеріальними препаратами в моделях *in vitro* доведено потенціювання протимікробної активності щодо полірезистентних умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів [7]. Також в умовах *in vitro* виявили підвищення сприйнятливості тест-культур бактерій до антибіотиків завдяки попередній обробці мікроорганізмів метаболітними комплексами [7].

У доступній фаховій літературі недостатньо висвітлені результати досліджень комбінованого застосування антимікробних препаратів і метаболітів пробіотичного походження в моделях *in vivo* [8,9]. Спільний вплив антибіотиків із метаболітним комплексом *L. rhamnosus GG* і *S. boulardii* на інфіковані рани в умовах *in vivo* раніше не вивчали. Послідовне (один за іншим) застосування продуктів життєдіяльності лактобактерій і сахаромікетів та антимікробних засобів для підвищення їхньої синергичної активності завдяки збільшенню чутливості тест-культур до антибіотиків у тестах *in vivo* також не досліджували.

Мета роботи

На моделі ран шкіри мурчаків, інфікованих полірезистентним штамом *Pseudomonas aeruginosa*, вивчити *in vivo* ефективність одночасного та послідовного застосування метаболітного комплексу *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* з антибактеріальним препаратом щодо обґрунтування перспективності його використання для розроблення «препаратів супроводження» до антибіотиків.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальні дослідження здійснили в лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України». Робота є продовженням серії робіт із цієї теми.

Методика отримання комбінації метаболітного комплексу *Lactobacillus rhamnosus* GG (симбіотик PREEMA®, «Schonen», Швейцарія) та *Saccharomyces boulardii* (препарат BULARDI®, «Schonen», Швейцарія), що передбачала культивування спільних культур лактобактерій і сахароміцетів в ультразвуковому дезінтеграторі лактобактерій (MLS), описана в попередній статті [10].

Як антибактеріальний препарат застосовували амікацин (амікацину сульфат, «Лекхім-Харків»). Тест-культура для дослідження – антибіотикорезистентний штам *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* PR) (резистентний до цефоперазону, цефепіму, іміпенему, меропенему), що отримали з колекції музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН», м. Харків. Оптичну щільність бактеріальної суспензії задавали за шкалою McFarland (приклад Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія). Концентрація тест-культури становила 10 одиниць за шкалою McFarland (~10⁹ КУО/мл).

Інфіковані шкірні рани псевдомонадної етіології моделювали на мурчаках. Тваринам механічним пошкодженням робили відкриті рани – в ділянці спини висікали шкіру площею 4 см². Рани інфікували місцевим нанесенням суспензії добової культури полірезистентного штаму *P. aeruginosa*. Дослідження виконали на 12 двомісячних особинах обох статей масою 250–260 г. Тварин поділили на 4 групи по 3 особи. На інфіковані рани наносили 0,9 % розчин натрію хлориду (контрольна група, К), амікацин – АБ (група Л I), MLS одночасно з АБ (група Л II), MLS почергово з АБ (група Л III). Щоденно двічі на добу рани обробляли речовинами (з додаванням до кожної групи для в'язкості поліетиленоксиду (ПЕО) з молекулярною масою 1500 і з молекулярною масою 400), що досліджували. Кінцева концентрація MLS відповідала мінімальній інгібуючій концентрації щодо пригнічення росту *P. aeruginosa* PR за тестами *in vitro* (0,21 мг/мл загального білка за методом Лоурі).

За клінічними показниками оцінювали стан тварин та інфіковані рани. Визначали загальне самопочуття мурчаків, активність, поведінку, апетит, візуально оцінювали стан їхньої шкіри та ран, які змодельовали. Для контролю процесів загоювання інфікованих ран використали мікробіологічні та планіметричні методи досліджень. Протимікробну активність за мікробіологічними показниками визначали за допомогою бактеріологічного дослідження матеріалу з контрольних і дослідних зразків інфікованих ран з ідентифікацією та визначенням

кількості колонійутворювальних одиниць (КУО) збудника. Перед взяттям матеріалу шкіру навколо рани обробляли 70° етиловим спиртом. Для мікроскопічного дослідження матеріал брали стерильним тампоном, наносили на стерильне предметне скло, фарбували за Грамом. Для бактеріологічного дослідження на найбільш ексудативній ділянці рани накладали стерильний фільтрувальний папір (1 см²) до повного просочування [11]. Якщо ексудату не було, матеріал брали стерильним фільтрувальним папером (1 см²) круговими обертовими рухами від центру до периферії ділянки рани. Поміщали в пробірку зі стерильним 0,9 % розчином натрію хлориду (1 мл), ретельно перемішували [11,12]. З дослідних і контрольних зразків готували послідовні розведення, з яких здійснювали висів на поверхню твердого живильного середовища (м'ясо-пептонний агар з додаванням 5 % крові). Посіви культивували за температури 37 ± 1 °С. Через добу підраховували кількість колоній, що вирости, та визначали кількість КУО псевдомонад в одиниці об'єму дослідного матеріалу, яку виражали в десятковому логарифмі КУО/мл (lg) [13].

Динаміку планіметричних показників інфікованих ран оцінювали на 1, 5, 8 і 11 добу після інфікування, визначали розміри ран, розраховували загальну площу рани у см² [14].

Площу загоєння рани розраховували за формулою:

$$S = S_0 - S_x,$$

де S_x – середнє значення площі рани на час дослідження см²; S_0 – вихідне середнє значення площі рани, см² [4].

Швидкість загоєння рани за певний період розраховували за формулою:

$$V = \frac{S_0 - S_x}{n},$$

де S_x – середнє значення площі рани на час дослідження см²; S_0 – вихідне середнє значення площі рани, см², n – день лікування [4].

Коефіцієнт швидкості загоєння рани за певний період розраховували за формулою:

$$V = \frac{S_0 - S_x}{S_0},$$

де S_x – середнє значення площі рани на час дослідження см²; S_0 – вихідне середнє значення площі рани, см² [4].

Репаративний ефект розраховували за формулою:

$$PE = \frac{S_k - S_d}{S_k} \times 100 \%,$$

де S_d – значення площі рани в дослідній групі, см²; S_k – значення площі рани в контрольній групі, см² [4].

Експериментальні дослідження на тваринах виконали відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.),

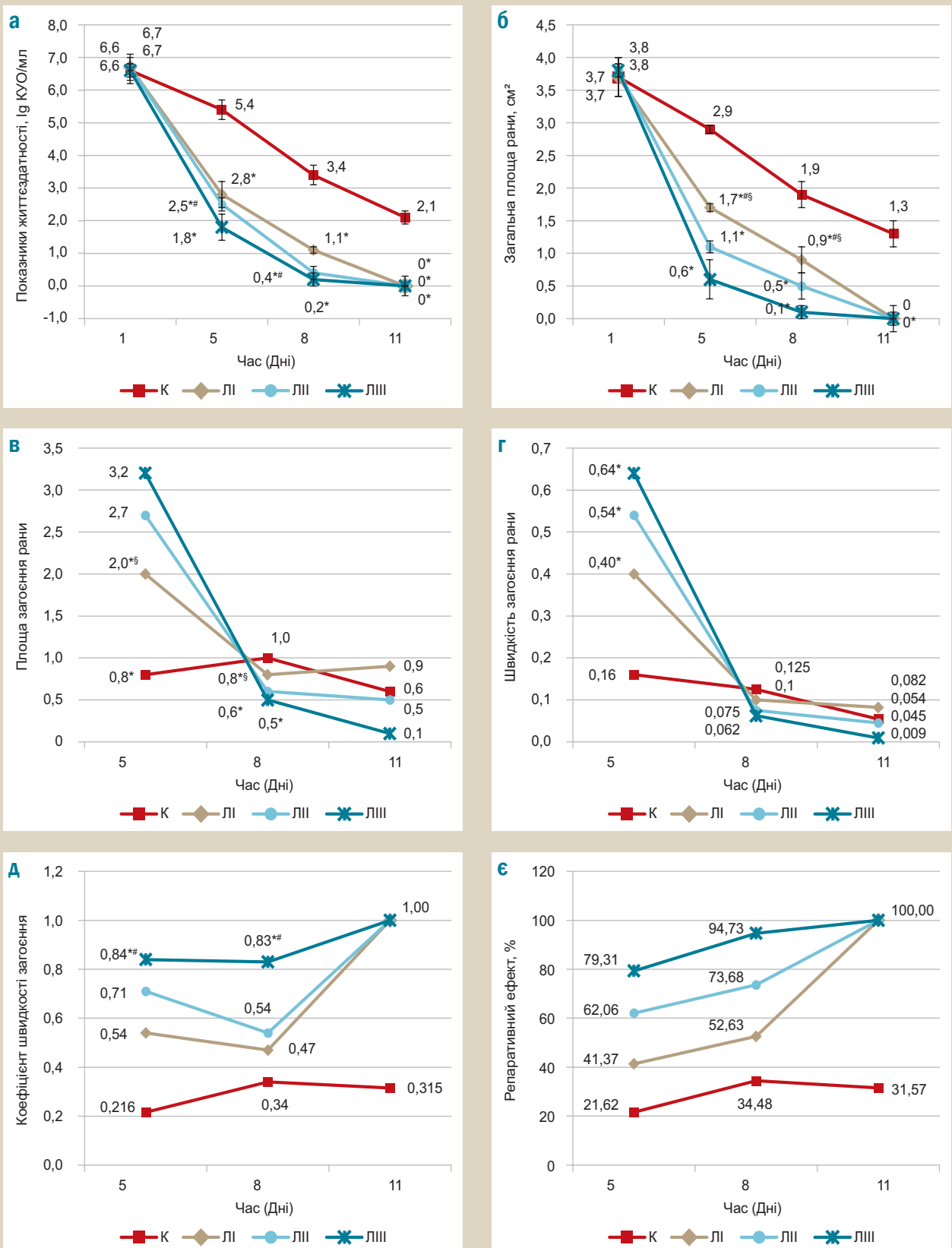


Рис. 1. Динаміка змін популяційного рівня полірезистентного штаму *P. aeruginosa* за визначенням кількості колонійутворювальних одиниць у матеріалі зразків інфікованих ран на 1, 5, 8, 11 добу (а). Динаміка змін планіметричних показників: загальної площі ран (б), площі загоєння ран (в), швидкості загоєння ран (г), коефіцієнта швидкості загоєння ран (д), репаративного ефекту ран (е), що інфіковані полірезистентним штамом *P. aeruginosa*, на 5, 8, 11 добу.

Дані наведені як середнє значення дослідних і контрольних зразків ($M \pm SD$, $n = 3$), відмінності вірогідні $p < 0,05$: * – між К і Л І/Л ІІ/Л ІІІ, § – між Л І і Л ІІ, # – між Л І і Л ІІІ.

положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації та директиви Європейського Співтовариства 2010/63/ЄС. Для знеболювання (до засинання) застосували тіопенталовий наркоз; спосіб уведення та дози – згідно з внутрішніми інструкціями ДУ «ІМІ НАМН», що відповідають національним і міжнародним стандартам.

Статистично результати експерименту опрацювали за допомогою Microsoft Office Excel 2007 та Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Перевірку гіпотези про нормальність розподілу для кожної вибірки виконали за допомогою критерію Пірсона. Вірогідність різниці між отриманими показниками різних груп визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з поправкою за тестом Бонферроні. Кореляційний аналіз даних виконали, застосувавши непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена (r). Відмінності вважали статистично значущими, коли значення були $p < 0,05$: * – між К і Л I/Л II/Л III, § – між Л I і Л II, # – між Л I і Л III. Експеримент повторювали тричі.

Результати

Унаслідок моделювання інфікованих шкірних ран (*in vivo*) протягом клінічних спостережень за тваринами визначили погіршення їхнього загального стану, активності, поведінки, апетиту. За візуальними спостереженнями змодельовані інфіковані полірезистентним штамом *P. aeruginosa* рани супроводжувалися клінічними проявами: почервонінням, набряком, виділенням ранового ексудату. Інфекційний процес підтверджено мікробіологічними показниками: рівень мікробної контамінації ран мурчаків на 1 добу експерименту становив від $6,6 \pm 0,5$ до $6,7 \pm 0,4$ КУО/мл (рис. 1а). Результати визначення КУО псевдомонад у матеріалі зразків інфікованих ран показали відмінності залежно від дослідних речовин і способу їх нанесення. На 5 добу кількість мікробних клітин збудника в ранах груп Л I, Л II та Л III була меншою, ніж контрольних в 1,9, 2,2 та 2,8 раза відповідно; на 8 – у 3,1, 8,5 та 17,0 раза відповідно ($p < 0,05$). Вірогідна різниця щодо зниження КУО встановлена між групами Л I та Л III ($p = 0,0005$), що доводить ефективність комбінованого послідовного застосування амікацину та MLS порівняно з амікацином. Вірогідно меншу кількість клітин *P. aeruginosa* визначили у групі Л III щодо Л II, починаючи з 5 дня дослідження ($p = 0,01$). На 11 добу експерименту спостерігали повну елімінацію збудника в усіх дослідних групах, на відміну від контрольної ($1,2 \pm 0,2$ КУО/мл). В інтактній групі спостерігали повільне зменшення кількості псевдомонад. Поступове загоснення інфікованих ран у мурчаків без лікування, ймовірно, зумовлено загальними та місцевими реакціями організму тварин на пошкодження, які забезпечують загоснення. Незважаючи на природні захисні реакції мурчаків, вірогідну різницю КУО всіх дослідних груп (Л I, Л II, Л III) щодо контролю спостерігали впродовж усього експерименту ($p < 0,05$). Це свідчить про ефективність обраних засобів для місцевого лікування інфікованих ран (рис. 1).

Процеси загоснення інфікованих ран у дослідних групах на 5 добу експерименту відповідали аналогічним змінам контрольних тварин у період із 8 до 11 доби: спостерігали зменшення ознак запалення, гіперемії тканин, що оточують, зменшення набряку. Загальні площі поверхонь ран

при послідовному випробуванні MLS і АБ (на 5 і 8 добу експерименту) статистично вірогідно менші порівняно з одночасним застосуванням (в 1,8 і 5,0 раза відповідно, $p = 0,03$) та щодо показників тварин, які отримували амікацин (у 2,8 і 9,0 раза відповідно, $p = 0,04$) (рис. 1б). Ці результати збігаються з даними щодо зниження КУО та свідчать про більшу ефективність комбінованого впливу MLS з антибактеріальними препаратами на відміну від амікацину завдяки синергічній дії.

Зменшення площ поверхонь ран у групі Л I також поступалися загосненню ран тварин групи Л II ($p = 0,02$) на 8–11 добу експерименту, що підтверджує ефективність комбінованого впливу MLS з антибактеріальним препаратом порівняно з окремим застосуванням антибіотика (рис. 1в). Розрахунок швидкості загоснення ран показав найбільші показники у групах Л I, Л II, Л III (в 2,5, 3,4, 4,0 раза відповідно) порівняно з контрольною групою на 5 добу експерименту (рис. 1а). Це підтверджує прискорений перехід ран дослідних тварин із фази запалення у фазу регенерації порівняно з інтактними.

Протягом усього дослідження швидкість загоснення ран була вірогідно більшою у групах Л II ($p = 0,01$) і Л III ($p = 0,03$) порівняно з Л I, а Л II поступалася Л III ($p = 0,002$). Результати швидшого загоснення ран у групі Л III щодо Л II свідчать про більшу ефективність послідовного (один за іншим) нанесення продуктів життєдіяльності лактобактерій і сахароміцетів та антимікробних засобів. Підвищення їхньої синергічної активності відповідає даним, що отримані в умовах *in vitro*, щодо збільшення чутливості тест-культур бактерій до антибіотиків завдяки попередньому обробленню мікроорганізмів метаболітними комплексами.

За коефіцієнтом швидкості загоснення всіх ран, які вивчали, найбільша різниця встановлена у разі послідовного застосування метаболітів з антибіотиком порівняно з тільки амікацином в 1,6 та 1,8 раза на 5 і 8 добу відповідно (рис. 1д). Результати аналізу репаративного ефекту ран під впливом АБ щодо контролю показали прискорення репаративних процесів на 19,75 %, 18,15 %, 68,43 % на 5, 8 і 11 добу відповідно (рис. 1е). Відсотки зменшення площ поверхонь ран, одночасно оброблених MLS з АБ, порівняно з контролем збільшувалися на 40,44 %, 39,20 %, 68,43 % на 5, 8 і 11 добу відповідно; у разі послідовного нанесення – на 57,69 %, 60,25 %, 68,43 % у ті самі строки.

Кореляційна залежність встановлена між показниками КУО збудника з матеріалу інфікованих ран і репаративними процесами ран у групах Л II ($r = -0,94$, $p = 0,002$) і Л III ($r = -0,99$, $p = 0,0003$) протягом усього експерименту, що свідчить про залежність зниження кількості мікробних клітин збудника в ранах та їхньої регенерації. Сильний кореляційний зв'язок, який визначили у групі Л III між кількістю життєздатних клітин збудника після впливу дослідних речовин і загальною площею рани ($r = 0,99$, $p = 0,1$) та між КУО тест-культури і площею загоснення рани ($r = 0,99$, $p = 0,1$), статистично невірогідний. Отже, у разі застосування метаболітного комплексу зниження КУО обраного полірезистентного мікроорганізму та зменшення загальної площі загоснення рани є окремими, не пов'язаними факторами. Це дає змогу припустити: зменшення площ поверхонь ран, які дослідили, та прискорення переходу у фазу регенерації

зумовлене не тільки бактерицидною та бактеріостатичною дією MLS з амікацином щодо обраної тест-культури. Імовірно, швидше загоювання ран та одужання мурчаків у групі Л III також спричинене здатністю MLS підвищувати сприйнятливість збудників до антибактеріальних препаратів, що доведено раніше в тестах *in vitro* щодо грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів.

Обговорення

Незважаючи на велику кількість експериментальних робіт з вивчення спільного впливу речовин мікробного походження з антибактеріальними препаратами в умовах *in vitro*, а також включення деяких лантабіотиків у клінічні й пізні доклінічні випробування щодо окремого їхнього використання, дослідження комбінованої дії антибіотиків із продуктами життєдіяльності мікроорганізмів у тестах *in vivo* обмежені.

Так, у моделях *in vivo* ефективність мікробіспорицину (з ґрунтової бактерії *Microbispora corallina*) збігалась або перевищувала ванкоміцин і лінезолід при гострих летальних інфекціях мишей і щурів, що викликані стійким до метициліну *Staphylococcus aureus*, пеніцилін-резистентним *Streptococcus pneumoniae* та стійким до ванкоміцину *Enterococcus* [15]. Вирощування названої ґрунтової бактерії складне, на відміну від простого способу отримання комплексу метаболітів, що розробили.

Інші автори встановили зниження нізиновими пов'язками на нановолокні стафілококового навантаження рани ($4,3 \times 10^2$ КУО/рану) порівняно з контрольними ($2,2 \times 10^7$ КУО/рану) в останній 7 день випробування та стимулювання закриття ран [12].

Наведені власні результати доповнюють наявні дані перевагою комбінованої терапії протимікробних препаратів із метаболітами пробіотичних штамів мікроорганізмів унаслідок можливості скорочення терміну лікування та застосування істотно нижчих концентрацій антибіотиків. Експериментальна робота, яку виконали, дала можливість встановити синергічну протипсевдомонадну активність MLS-амікацин щодо пріоритетного збудника захворювань в умовах *in vivo*, зокрема щодо інфекційних ран, що викликані антибіотикорезистентним мікроорганізмом. Їхній комбінований протимікробний ефект, імовірно, зумовлений не тільки синергічною активністю. Відомо, що ліпополісахариди та пептиди бактеріального походження при накопиченні в інфікованій рані можуть прискорювати спрямоване пересування нейтрофілів. Нейтрофіли очищують змертвілу тканину та фагоцитують інфекційні бактерії [16]. Метаболітні комплекси, що одержані авторським методом, за біохімічною характеристикою є протеїнами, містять пептиди з домішками ліпідів і полісахаридів. Можливо, причина прискороного загоєння – безпосереднє нанесення на рану багатокомпонентних за складом речовин лактобактерій і сахароміцетів, які відіграють ключову роль в успішному скороченні фази запалення та помітному наблизненні фази регенерації. Швидше загоювання ран та одужання мурчаків, імовірно, спричинене антиадгезивними та протибіоплівковими властивостями MLS, що встановили в умовах *in vitro* щодо процесу формування та попередньо сформованих біоплівков полірезистентних умовно-патогенних і патогенних бактерій [17].

У цій роботі вперше запропоновано послідовне (один за іншим) нанесення MLS та антибактеріального препарату, доведено ефективність способу (в тестах *in vivo*). Більш виражену синергічну протимікробну активність метаболітного комплексу та амікацину при послідовному випробуванні раніше встановлено в умовах *in vitro* [18]. Їхня ефективність зумовлена не тільки синергічним впливом, але і здатністю комбінації метаболітів посилювати чутливість тест-культур до антибіотиків [18]. Підвищення синтетичними пептидами сприйнятливості стійких до β-лактамних антибіотиків клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae* також встановлено іншими авторами в тестах *in vitro* [19]. Імовірно, нанесення метаболітного комплексу та амікацину один за іншим в умовах *in vivo* також підвищує чутливість збудників до антибіотиків. Це додатково збільшує синергічну протимікробну активність MLS-амікацин, що і зумовлює кращі результати порівняно з одночасним застосуванням препаратів.

Висновки

1. На моделі інфікованих полірезистентним штамом *Pseudomonas aeruginosa* ран встановили синергічну протимікробну активність амікацину з метаболітним комплексом *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, що отриманий за авторським способом.

2. Комбінований вплив метаболітного комплексу лактобактерій і сахароміцетів з амікацином супроводжувався вірогідним зменшенням загальних площ поверхонь ран у мурчаків в 1,5 і 1,8 раза ($p < 0,05$) та зниженням кількості КУО псевдомонад в 1,2 і 2,7 раза ($p < 0,05$) на 5 і 8 добу експерименту порівняно з групою, тварини якої отримували тільки амікацин.

3. Доведена перевага послідовного (один за іншим) нанесення MLS та амікацину порівняно з одночасним: загальні площі поверхонь ран у тварин групи Л III статистично вірогідно менші в 1,8 і 5,0 раза, а кількість псевдомонад менша в 1,4 та 2,0 раза на 5 і 8 добу експерименту порівняно з мурчачами групи Л II.

4. Наведені результати вираженого синергічного ефекту амікацину та метаболітного комплексу *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* доводять його перспективність для практичної медицини та фармацевтичної промисловості, відкривають можливість конструювання на основі біологічно активних речовин пробіотичного походження «препаратів супроводження» до антибіотиків для підвищення ефективності терапії інфекційних хвороб, як-от інфікованих ран.

Перспективи подальших досліджень передбачають дослідження біохімічного складу структурно-метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* та їхніх комбінацій.

Фінансування

Робота виконана в рамках НДР ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідо-пробіотиків» (НАМН 146/2019), № держреєстрації 0119U100686.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 30.03.2020
Після доопрацювання / Revised: 18.05.2020
Прийнято до друку / Accepted: 01.06.2020

Відомості про авторів:

Ісаєнко О. Ю., канд. мед. наук, провідний науковий співробітник лабораторії профілактики краплинних інфекцій, ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

Мінухін В. В., д-р мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків.

ORCID ID: [0000-0002-9682-9686](https://orcid.org/0000-0002-9682-9686)

Рижкова Т. М., д-р техн. наук, професор, доцент каф. технології переробки, стандартизації та технічного сервісу, Харківська державна зооветеринарна академія, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-8811-5547](https://orcid.org/0000-0001-8811-5547)

Коцар О. В., канд. мед. наук, доцент каф. мікробіології, вірусології та імунології імені Д. П. Гриньова, Харківський національний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-3797-1068](https://orcid.org/0000-0002-3797-1068)

Information about authors:

Isaienko O. Yu., MD, PhD, Leading researcher of the Laboratory of Respiratory Infections Prevention, State Institution "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

Minukhin V. V. MD, PhD DSc, Professor, Director of the State institution "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv.

Ryzhkova T. M., PhD, DSc, Professor, Associate Professor of the Department of Processing Technology, Standardization and Technical Service, Kharkiv State Zooveterinary Academy, Ukraine.

Kotsar O. V., MD, PhD, Associate Professor of D. P. Grynov Department of Microbiology, Virology and Immunology, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Сведения об авторах:

Исаенко Е. Ю., канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики капельных инфекций, ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков.

Минухин В. В., д-р мед. наук, профессор, директор ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков.

Рыжкова Т. М., д-р техн. наук, профессор, доцент каф. технологии переработки, стандартизации и технического сервиса, Харьковская государственная зооветеринарная академия, Украина.

Коцарь Е. В., канд. мед. наук, доцент каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии имени Д. П. Гринева, Харьковский национальный медицинский университет, Украина.

Список літератури

- [1] WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *World Health Organization*, 27 February 2017. URL : <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [2] Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями при ожоговой травме / Т. Д. Фомичева и др. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018. № 3. С. 72-74. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.72-74>
- [3] Фадеев С. Б. Динамика видового состава микрофлоры очагов хирургической инфекции мягких тканей в течение заболевания. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2013. № 3. С. 1-12.
- [4] Изучение ранозаживляющего действия гелей с наночастицами серебра у животных с гнойными ранами / Л. А. Булыга и др. *Вестник фармации*. 2015. № 2. С. 62-68.
- [5] Antimicrobial activity of preparations after combined cultivation of lactic acid bacteria and yeast strains / T. R. Balabekyan et al. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2018. Vol. 102. Issue 4. P. 933-938. <https://doi.org/10.1111/jpn.12891>

- [6] Ісаєнко О. Ю. Протидифтерійні властивості структурно-метаболітичних комплексів пробіотичних штамів лактобактерій і сахароміцетів у тестах in vitro та in vivo. *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65. № 6. С. 51-60. <https://doi.org/10.15407/fz65.06.051>
- [7] Isayenko O. Y. Synergistic activity of filtrates of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* and antibacterial preparations against *Corynebacterium* spp. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10. Issue 4. P. 445-456. <https://doi.org/10.15421/021966>
- [8] Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics / H. Hanchi et al. *Future Microbiology*. 2017. Vol. 12. Issue 3. P. 205-212. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0113>
- [9] Валышев А. В., Валышева Н. А. Комбинация антибиотиков и бактериоцинов – эффективный способ борьбы с резистентными микроорганизмами. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. № 4. С. 1-6.
- [10] Протимікробна активність структурно-метаболітичних комплексів *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* щодо *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 / О. Ю. Ісаєнко, О. В. Коцар, Т. М. Рижкова, Є. М. Бабич. *Запорізький медичний журнал*. 2020. Т. 22. № 4. С. 540-546. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.4.208396>
- [11] Bacterial Load Predicts Healing Rate in Neuropathic Diabetic Foot Ulcers / L. Xu et al. *Diabetes Care*. 2007. Vol. 30. Issue 2. P. 378-380. <https://doi.org/10.2337/dc06-1383>
- [12] Heunis T. D., Smith C., Dicks L. M. Evaluation of a Nisin-Eluting Nanofiber Scaffold To Treat *Staphylococcus aureus*-Induced Skin Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013. Vol. 57. Issue 8. P. 3928-3935. <https://doi.org/10.1128/AAC.00622-13>
- [13] Вплив умов зберігання фільтратів бульйонних культур пробіотиків на їхню протимікробну активність / О. Ю. Ісаєнко та ін. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2017. Т. 27. № 4. P. 311-321. <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.311>
- [14] Самаева Е. В. Сравнительная характеристика особенностей течения регенераторных процессов при пересадке культивированных дермальных аутофибробластов и лечении мазью «Левомеколь». *Universum: медицина и фармакология*. 2016. № 6. URL : <https://7universum.com/ru/med/archive/item/3290>
- [15] Efficacy of the New Lantibiotic NAI-107 in Experimental Infections Induced by Multidrug-Resistant Gram-Positive Pathogens / D. Jabés et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011. Vol. 55. Issue 4. P. 1671-1676. <https://doi.org/10.1128/AAC.01288-10>
- [16] Звягинцева Т. В., Халин И. В. Метаболитотропная терапия хронических ран. Харьков : ФООП Вировець А. П., 2011. 180 с.
- [17] Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria / О. Y. Isayenko et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019. Vol. 10. Issue 1. P. 3-8. <https://doi.org/10.15421/021901>
- [18] Simultaneous and sequential influence of metabolite complexes of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* and antibiotics against poly-resistant Gram-negative bacteria / О. Y. Isayenko et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11. Issue 1. P. 139-145. <https://doi.org/10.15421/022021>
- [19] Antibiofilm Peptides Increase the Susceptibility of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to β -Lactam Antibiotics / S. M. Ribeiro et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015. Vol. 59. Issue 7. P. 3906-3912. <https://doi.org/10.1128/AAC.00092-15>

References

- [1] World Health Organization. (2017, February 27). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [2] Fomicheva, T. D., Turkutyukov, V. B., Sotrichenko, S. A., Terekhov, S. M., Skurikhina, Yu. E., & Okrokov, M. V. (2018). Mikrobiologicheskii monitoring v sisteme epidemiologicheskogo nadzora za gnoino-septicheskimy infektsiyami pri ozhogovoi travme [Microbiological monitoring in the epidemiological surveillance system for purulent-septic infections in case of burn injury]. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal*, (3), 72-74. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.3.72-74> [in Russian].
- [3] Fadeev, S. B. (2013). Dinamika vidovogo sostava mikroflory ochagov khirurgicheskoi infektsii myagkikh tkanei v techenie zabolevaniya [The dynamics of species structure of microflora of foci surgical soft tissue infection in the course of the disease]. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra Uro RAN*, (3), 1-12. [in Russian].
- [4] Buliga, L. A., Chernykh, V. P., Movchan, B. A., Shtrygol, S. Y., Butko, Y. A., Ruban, E. A., & Gorbach, T. V. (2015). Izuchenie ranozazhivlyushchego deistviya gelei s nanochastitsami serebra u zhivotnykh s gnoynymi ranami [The studies of wounds healing activity of gels with nanoparticles of silver in animals with purulent wounds]. *Vestnik farmatsii*, (2), 62-68. [in Russian].

- [5] Balabekyan, T. R., Karapetyan, K. J., Khachatryan, T. V., Khachatryan, G. E., & Tatikyan, S. S. (2018). Antimicrobial activity of preparations after combined cultivation of lactic acid bacteria and yeast strains. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(4), 933-938. <https://doi.org/10.1111/jpn.12891>
- [6] Isayenko, O. Y. (2019). Protydyferiini vlastyivosti strukturno-metabolitnykh kompleksiv probiotychnykh shtamiv laktobakterii i sakharonitsetiv u testakh in vitro ta in vivo [Anti-diphtheria properties of structural-metabolites complexes of Lactobacteria and Saccharomyces probiotic strains]. *Fiziolohichnyi zhurnal*, 65(6), 51-60. <https://doi.org/10.15407/fz65.06.051> [in Ukrainian].
- [7] Isayenko, O. Y. (2019). Synergistic activity of filtrates of Lactobacillus rhamnosus and Saccharomyces boulardii and antibacterial preparations against Corynebacterium spp. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(4), 445-456. <https://doi.org/10.15421/021966>
- [8] Hanchi, H., Hammami, R., Gingras, H., Kourda, R., Bergeron, M. G., Ben Hamida, J., Ouellette, M., & Fliss, I. (2017). Inhibition of MRSA and of Clostridium difficile by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. *Future Microbiology*, 12(3), 205-212. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0113>
- [9] Valyshev, A. V., & Valysheva, N. A. (2016). Kombinatsiya antibiotikov i bakteriotitsinov – effektivnyi spsob bor'by s rezistentnyimi mikroorganizmami [Combination of antibiotics and bacteriocins – effective way for fighting resistance microorganisms]. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*, (4), 1-6. [in Russian].
- [10] Isaienko, O. Yu., Kotsar, O. V., Ryzhkova, T. M., & Babych, Ye. M. (2020). Protymikrobna aktyvnist strukturno-metabolitnykh kompleksiv L. rhamnosus GG i S. boulardii shchodo S. aureus ATSS 25923, E. coli ATCC 25922, R. aeruginosa ATCC 27853 [Antimicrobial activity of structural-metabolic complexes of L. rhamnosus GG and S. boulardii against S. aureus ATCC 25923, E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853]. *Zaporozhye medical journal*, 22(4), 540-546. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2020.4.208396> [in Ukrainian].
- [11] Xu, L., McLennan, S. V., Lo, L., Natfaji, A., Bolton, T., Liu, Y., Twigg, S. M., & Yue, D. K. (2007). Bacterial Load Predicts Healing Rate in Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*, 30(2), 378-380. <https://doi.org/10.2337/dc06-1383>
- [12] Heunis, T. D., Smith, C., & Dicks, L. M. (2013). Evaluation of a Nisin-Eluting Nanofiber Scaffold To Treat Staphylococcus aureus-Induced Skin Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3928-3935. <https://doi.org/10.1128/AAC.00622-13>
- [13] Isaienko, O. Yu., Knysh, O. V., Babych, Ye. M., Kompaniets, A. M., Osetsky, O. I., Polianska, V. P., & Zachepylo, S. V. (2017). Vplyv umov zberihannia filtrativ bulionnykh kultur probiotyktiv na yikhniu protymikrobnu aktyvnist [Influence of Storage of Probiotic Broth Culture Filtrates on Their Antimicrobial Activity]. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 27(4), 311-321. <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.311> [in Ukrainian].
- [14] Samaeva, E. (2016). Sravnitel'naya kharakteristika osobennostei techeniya regeneratorykh protsessov pri peresadke kul'tivirovannykh dermal'nykh autofibroblastov i lechenii maz'yu «Levomekol» [The comparative analysis of regenerative processes flow phenomena when transplanting incubate dermal auto-fibroblasts and treatment with the ointment «Levomekol»]. *Universum: meditsina i farmakologiya*, (6). <https://7universum.com/ru/med/archive/item/3290> [in Russian].
- [15] Jabés, D., Brunati, C., Candiani, G., Riva, S., Romanó, G., & Donadio, S. (2011). Efficacy of the New Lantibiotic NAI-107 in Experimental Infections Induced by Multidrug-Resistant Gram-Positive Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1671-1676. <https://doi.org/10.1128/AAC.01288-10>
- [16] Zvyagintseva, T. V., & Khalin, I. V. (2011). *Metabolitotropnaya terapiya khronicheskikh ran* [Metabolitotropic therapy of chronic wounds]. FOP Vyrovets A. P. [in Russian].
- [17] Isayenko, O. Y., Knysh, O. V., Babych, Y. M., Ryzhkova, T. N., & Dyukareva, G. I. (2019). Effect of disintegrates and metabolites of Lactobacillus rhamnosus and Saccharomyces boulardii on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 10(1), 3-8. <https://doi.org/10.15421/021901>
- [18] Isayenko, O. Y., Knysh, O. V., Kotsar, O. V., Ryzhkova, T. N., & Dyukareva, G. I. (2020). Simultaneous and sequential influence of metabolite complexes of Lactobacillus rhamnosus and Saccharomyces boulardii and antibiotics against poly-resistant Gram-negative bacteria. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(1), 139-145. <https://doi.org/10.15421/022021>
- [19] Ribeiro, S. M., de la Fuente-Núñez, C., Baquir, B., Faria-Junior, C., Franco, O. L., & Hancock, R. E. (2015). Antibiofilm Peptides Increase the Susceptibility of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates to β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 3906-3912. <https://doi.org/10.1128/AAC.00092-15>