

DOI: 10.26693/jmbs05.03.282

УДК 615.372:[615.331+615.339]:576.524

Ісаєнко О. Ю.<sup>1</sup>, Книш О. В.<sup>1</sup>, Мінухін В. В.<sup>1</sup>, Рижкова Т. М.<sup>2</sup>, Дюкарева Г. І.<sup>3</sup>

## АНТИАДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕТАБОЛІТНИХ КОМПЛЕКСІВ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG ТА *SACCHAROMYCES BOULARDII* В ТЕСТАХ IN VITRO

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут мікробіології та імунології  
ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

<sup>2</sup>Харківська державна зооветеринарна академія, Україна

<sup>3</sup>Харківський торговельно-економічний коледж Київського національного торговельно-  
економічного університету, Україна

el\_isaenko@ukr.net

Метою роботи стало вивчення *in vitro* здатності метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*, одержаних за авторською методикою, впливати на адгезію мікробних клітин для обґрунтування перспективності їхнього використання щодо розробки нових поліфункціональних препаратів.

Дослідження *in vitro* адгезії бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus* 209-P проводили після їхньої обробки або обробки еритроцитів дезінтегратами (одержані ультразвуковим опроміненням клітин *Lactobacillus rhamnosus* GG або *Saccharomyces boulardii*) і метаболітами (отримані культивуванням лактобактерій та сахароміцетів у власних дезінтегратах, а їхня комбінація – в дезінтегратах лактобактерій).

Найбільше статистично достовірне інгібування адгезії оброблених клітин *S. aureus* відбувалося метаболітами *L. rhamnosus*, отриманими культивуванням продуцентів у власних структурних компонентах, (на 17,19%,  $P=0,0005$ ) та метаболітами *S. boulardii*, отриманими культивуванням продуцентів у структурних компонентах *L. rhamnosus*, (на 11,03%,  $P=0,006$ ). Максимальне пригнічення адгезії *S. aureus* при обробці еритроцитів також здійснювалося метаболітами *L. rhamnosus* (на 14,9%,  $P=0,005$ ) та метаболітами *S. boulardii* (на 12,98%,  $P=0,02$ ). Незалежно від способу обробки (еритроцитів або клітин стафілококу) нижчими антиадгезивними властивостями володіли дезінтеграт лактобактерій та комбінація метаболітів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* (на 4,12%–5,63%). Відсутність пригнічення адгезії клітин збудника до еритроцитів відмічалася при обробці стафілококу метаболітами *S. boulardii*, отриманими культивуванням продуцентів у власних структурних компонентах, а при обробці еритроцитів ще і дезінтегратом *S. boulardii*.

Представлені результати можуть стати у нагоді при створенні на основі метаболітних комплексів *Lactobacillus* і *Saccharomyces* протимікробних препаратів нового покоління.

**Ключові слова:** адгезія, метаболіти, антиадгезивні властивості, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження є розділом НДР лабораторії профілактики краплинних інфекцій Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Мікробіологічна характеристика нових структурно–метаболітних комплексів лакто– та біфідо–пробіотиків» (НАМН 146/2019), № держ. реєстрації 0119U100686.

**Вступ.** Попередником розвитку будь-якого інфекційного процесу являється прикріплення мікробних клітин збудника до біологічного об'єкту. Також, адгезія є первинним етапом утворення біоплівки патогенними мікроорганізмами, боротьба з якими значно складніша ніж з планктонними формами. Високою ефективністю щодо здатності запобігати утворенню біоплівок, стимулювати їх руйнування, протимікробно діяти на різні види бактерій та грибів, боротися з антибіотикорезистентними збудниками володіють пробіотичні штами мікроорганізмів. Незважаючи на низьку переваг, вони мають декілька суттєвих недоліків. Наприклад, в умовах *in vivo* доведено, що пробіотик *E. coli* Nissle 1917 року викликає ушкодження ДНК [1, 2]. Його побічні ефекти пов'язують із розвитком колоректальної карциноми [2]. Також встановлено, що ряд невеликих або шкідливих результатів щодо пробіотичних мікроорганізмів взагалі не публікуються [3]. Тому, для клінічного застосування пропонують розробити альтернативні живим пробіотикам речовини, які

наряду з високою активністю відзначалися б більшою безпечністю [1]. Отже, на сьогодні актуальним залишається пошук речовин, здатних не лише запобігати утворенню біоплівки, пошкоджувати їх, протимікробно діяти на гриби та бактерії, особливо антибіотикорезистентні, а і інгібувати, краще запобігати, процесу адгезії. Отримані за авторським способом метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* володіють вираженими протимікробними і протибіоплівковими властивостями по відношенню до процесу утворення та попередньо сформованих біоплівок, що доведено в тестах *in vitro* [4, 5]. Також проявляють синергічну активність з антибактеріальними препаратами за тестами *in vitro* та *in vivo* [6]. Оказують протимікробну, ранозагоюючу та профілактично-лікувальну дію в умовах *in vivo*. Попередні перспективні результати застосування метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG з профілактично-лікувальною метою (*in vivo*) спонукали нас до вивчення їхніх антиадгезивних властивостей (*in vitro*) щодо можливості пригнічувати адгезію патогенних мікроорганізмів.

**Мета роботи** – вивчення *in vitro* здатності метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii*, одержаних за авторською методикою, впливати на адгезію мікробних клітин для обґрунтування перспективності їхнього використання щодо розробки нових поліфункціональних препаратів.

**Матеріал та методи дослідження.** Метаболітні комплекси отримували із мікробних клітин *Lactobacillus rhamnosus* GG (симбіотик PREEMA®, «Schonen», Швейцарія) та *Saccharomyces boulardii* (пробіотичний препарат BULARDI®, «Schonen», Швейцарія). Дослідження антиадгезивних властивостей проводили на штамі *Staphylococcus aureus* 209-P, який зберігається в колекції мікроорганізмів лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН». Експериментальні штами за своїми морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями були типовими. Живильні середовища для вирощування мікроорганізмів готували та контролювали відповідно до вимог виробника (сертифікати до продукції та за Інформаційним листом МОЗ України № 05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль поживних середовищ», Київ, 2000).

Суспензії пробіотичних мікроорганізмів готували відповідно до стандарту мутності за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія) і доводили до оптичної щільності 10,0 од. McFarland.

Отримання структурних компонентів (ультразвукових дезінтегратів) *L. rhamnosus* GG (L) і *S. boulardii* (S) здійснювали ультразвуковим випро-

мінюванням генератору ГЗ–109 [7, 8], які в подальшому застосовували для вирощування пробіотичних культур *L. rhamnosus* та *S. boulardii* і вивчення щодо впливу на адгезію бактеріальних клітин. Перед дослідженням структурні компоненти центрифугували при 1000 g протягом 30 хв, а супернатант фільтрували за допомогою мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 з діаметром пор 0,2 мкм [7, 8].

Метаболіти (продукти життєдіяльності) *L. rhamnosus* (ML) або *S. boulardii* (MS) отримували культивуванням продуцентів у власних структурних компонентах, метаболітів *S. boulardii* – у структурних компонентах *L. rhamnosus* (LS), комбінації метаболітів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* – у структурних компонентах лактобактерій (MLS) [7, 8].

Досліджено шість експериментальних зразків: фільтрати ультразвукових дезінтегратів лактобактерій (L) і сахароміцетів (S) (містять структурні компоненти бактеріальних клітин); фільтрати культур лактобактерій (ML), сахароміцетів (MS), вирощених у власних ультразвукових дезінтегратах (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин або грибів); фільтрати спільних культур лактобактерій із сахароміцетами (MLS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин і грибів); фільтрати культур сахароміцетів (LS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітні комплекси бактеріальних клітин і грибів).

Адгезію бактеріальних клітин *S. aureus*, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів, вивчали за наступними методиками [9, 10]. В усі дослідні та контрольні пробірки вносили по 700 мкл суспензії *S. aureus*. В дослідні додавали по 300 мкл метаболітного комплексу, а контрольні – 0,9% розчин натрію хлориду. Після витримки при 37°C впродовж 30 хвилин в усі пробірки вносили по 500 мкл необроблених відмитих еритроцитів. При постійному струшуванні витримували ще 30 хвилин при 37°C. Наступним етапом пробірки центрифугували при 1000 об/хв 2 хв. З кожної пробірки вносили в лунки стерильних полістиролових плоскодонних 96-ти лункових планшетів (ТОВ «Ексімкаротрейд», Україна) по 150 мкл вмісту. Оптичну щільність дослідних і контрольних зразків вимірювали за допомогою 8-канального мікропланшетного аналізатора «Lisa Scan™ EM» (Erba Mannheim, Чехія) при довжині хвилі 578 нм. За зміною оптичної щільності дослідної проби у порівнянні з контрольною судили про наявність чи відсутність впливу досліджуваних речовин на адгезію збудника. Кількість адгезійних клітин (адгезію) розраховували за формулою [10]:

$$\% \text{ адгезійних клітин} = 100 - \frac{\text{Од}}{\text{Ок}} \times 100,$$

де Од – оптична щільність дослідної проби, Он – оптична щільність контрольної проби.

Адгезію бактеріальних клітин *S. aureus* до еритроцитів, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів, вивчали за наступними методиками [9, 10]. Попередньо відмиті еритроцити інкубували з метаболітними комплексами (дослідні проби) та з 0,9% розчином натрію хлориду (контрольні проби) у співвідношенні 1:1 протягом 30 хвилин при 37°C. В усі дослідні та контрольні пробірки вносили по 700 мкл суспензії *S. aureus* та 300 мкл 0,9% розчину натрію хлориду. Потім в дослідні пробірки додавали 500 мкл еритроцитів, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів, в контрольні – 500 мкл еритроцитів, оброблених 0,9% розчином натрію хлориду. При постійному струшуванні витримували 30 хвилин при 37°C. Наступним етапом пробірки центрифугували при 1000 об/хв 2 хв. З кожної пробірки вносили в лунки стерильних полістиролових плоскодонних 96-ти лункових планшетів (ТОВ «Ексімкарготрейд», Україна) по 150 мкл вмісту. Оптичну щільність дослідних і контрольних зразків вимірювали за допомогою 8-канального мікропланшетного аналізатора «Lisa Scan™ EM» (Erba Mannheim, Чехія) при довжині хвилі 578 нм. За зміною оптичної щільності дослідної проби у порівнянні з контрольною судили про наявність чи відсутність впливу досліджуваних речовин на адгезію збудника. Кількість адгезійних клітин (адгезію) розраховували за формулою [10]:

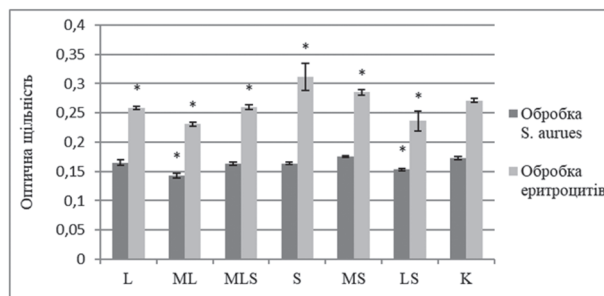
$$\% \text{ адгезійних клітин} = 100 - \frac{\text{Од}}{\text{Ок}} \times 100,$$

де Од – оптична щільність дослідної проби, Он – оптична щільність контрольної проби.

Експериментальні дослідження проводили тричі. Результати обробляли статистично з використанням програми Statistica 6.0. Достовірність різниці між отриманими показниками контрольних та дослідних груп визначали за критерієм t Стьюдента, розбіжності вважали достовірними при  $P < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Вивчення адгезії бактеріальних клітин *Staphylococcus aureus* 209-P після їхньої обробки або обробки еритроцитів метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів показали близькі результати (рис. 1).

Після впливу L, MLS, S на мікробні клітини збудника спостерігалось зниження оптичної щільності експериментальних зразків відносно контрольних: адгезія мікроорганізмів зменшувалася на 4,12%, на 5,63%, на 5,17% відповідно. Найбільше статистич-



**Рис. 1.** Показники оптичної щільності мікробних клітин *Staphylococcus aureus* 209-P після їхньої обробки або обробки еритроцитів фільтратами дезінтегратів лактобактерій (L), фільтратами метаболітів лактобактерій, отриманими культивуванням продуцентів у власних дезінтегратах (ML), метаболітами лактобактерій і сахароміцетів, отриманими культивуванням мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій (MLS), фільтратами дезінтегратів сахароміцетів (S), фільтратами метаболітів сахароміцетів, отриманими культивуванням грибів у власних дезінтегратах (MS), метаболітами сахароміцетів, отриманими культивуванням грибів у дезінтегратах лактобактерій (LS), 0,9% розчином натрію хлориду (K)

**Примітка:** \* – різниця дослідних проб щодо контрольних статистично значуща ( $p < 0,05$ ).

но достовірне інгібування адгезії *S. aureus* встановлено при витримки клітин із пробами ML (на 17,19%,  $P=0,0005$ ) та LS (на 11,03%,  $P=0,006$ ). Антиадгезивні властивості були відсутні у MS. Після обробки ними мікроорганізмів пригнічення адгезії стафілококу не відбувалося, а навпаки, спостерігалася тенденція до посилення процесу адгезування клітин на 1,92% ( $P=0,1$ ).

Вивчення адгезії бактеріальних клітин *S. aureus* до еритроцитів, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів відрізнялися від адгезії бактеріальних клітин *S. aureus*, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів, відсутністю антиадгезивних властивостей не лише у MS, а і у S. Після впливу зазначених речовин на еритроцити спостерігалось підвищення здатності мікроорганізмів до адгезування на 14,9% ( $P=0,04$ ) при застосуванні MS та на 5,09% ( $P=0,03$ ) при випробуванні S. Найбільше статистично достовірне інгібування адгезії *S. aureus* при обробці еритроцитів відбувалося, як і при обробці мікробних клітин стафілококів, пробами ML та LS. Додавання до еритроцитів зразків ML супроводжувалося пригніченням адгезії *S. aureus* на 14,9% ( $P=0,005$ ), а LS – на 12,98% ( $P=0,02$ ). Нижчими антиадгезивними властивостями володіли проби L, MLS, що супроводжувалося менш вираженим зниженням оптичної щільності зазначених зразків відносно контрольних. Інгібування адгезії мікроорганізмів після обробки еритроцитів L відбувалося на 4,79% ( $P=0,01$ ), а MLS – на 4,35% ( $P=0,01$ ).

Результати впливу метаболітів і структурних компонентів *L. rhamnosus* і *S. boulardii* на адгезію мікробних клітин стафілококу показали близькі результати за зміною оптичної щільності дослідних зразків відносно контрольних. Показники оптичної щільності мікробних клітин *S. aureus* після їхньої обробки та обробки еритроцитів метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів максимально зменшувалися під впливом проб ML та LS (на 11,03% – 17,19%). Також незалежно від способу обробки (еритроцитів або клітин стафілококу) нижчими антиадгезивними властивостями володіли зразки L та MLS (на 4,12% – 5,63%). Відсутність впливу на адгезію мікробних клітин *S. aureus* до еритроцитів спостерігалася при обробці стафілококу пробами MS та при обробці еритроцитів зразками S та MS.

Отримані результати антиадгезивних властивостей метаболітних комплексів лактобактерій і сахароміцетів збігаються з літературними даними інших досліджень щодо пригнічення адгезії мікроорганізмів мікробними клітинами, їхніми похідними та продуктами життєдіяльності [11–20]. Пробиотичний штам *L. rhamnosus* GG зменшував адгезію та інвазію *L. monocytogenes* до клітинної лінії карциноми товстої кишки людини Caco-2 [11]. Іншими дослідниками вивчено вплив декількох штамів *Lactobacillus* щодо прикріплення патогенних мікроорганізмів до клітин Caco-2. Найвищу адгезивну активність проявляла культура *L. salivarius* MSMC105-3 (3,54±0,77%) у порівнянні з *L. plantarum* MSMC171-1 (1,12±0,2%), *L. casei* MSMC39-3 (1,02±0,12%) та *L. paracasei* MSMC39-1 (0,96±0,23%). Рівень адгезії штаму *L. salivarius* MSMC105-3 статистично достовірно відрізнявся від інших обраних культур *Lactobacillus* ( $P < 0,05$ ), а вірогідної різниці між іншими культурами щодо їхніх антиадгезивних властивостей не встановлено. Також авторами доведено гальмування адгезії *Salmonella typhi* DMST5784 і *Shigella dysenteriae* DMST15111 до клітин Caco-2 біологічно активними речовинами *L. salivarius* MSMC105-3 [12]. В даній роботі, як і власних експериментах, для вивчення можливості впливу біологічно активних комплексів на адгезію мікроорганізмів дослідні речовини спільно інкубували з патогенними збудниками та клітинами Caco-2, в результаті чого отримано зниження адгезії мікробних клітин.

Порівнюючи власні результати з подібними роботами наступних авторів нами підтверджена різна ступень антиадгезивної активності речовин мікроорганізмів відносно патогенних збудників [10, 13, 14]. Так, супернатант культуральної рідини *B. cereus* штаму ІМВ Ас-5017 (0,25 мг/мл) знижував адгезію *P. aeruginosa* П-55 на склі на 72%. При зменшенні концентрації дослідних речовин знижен-

ня кількості прикріплених клітин відбувалося на 45-50% [10]. Біологічно активні речовини, синтезовані *P. aeruginosa* LBI (0,4 мг/мл), зменшували кількість адгезивних клітин *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *S. aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *L. monocytogenes* ATCC 19112 25, *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698, *L. monocytogenes* ATCC 191124, *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698 на 70-80% [13]. В роботі Mataraci зі співавт. [14] досліджено *in vitro* активність декількох антимікробних катіонних пептидів, серед яких був нізин (антибіотик, утворений *Streptococcus lactis*), окремо або в поєднанні з даптоміцином, лінезолідом, тейхопланіном, азитроміцином, ципрофлоксацином проти *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300. Всі антимікробні пептиди та їхні комбінації інгібували прикріплення бактерій при 1/10 MIC та утворення біоплівки збудника при 1 xMIC. Щодо планктонних клітин спостерігався переважно адитивний ефект [14].

Відмінності антиадгезивних властивостей метаболітних комплексів лактобактерій і сахароміцетів також співпадають з даними різного антиадгезивного ефекту різних штамів мікроорганізмів одного виду, встановленими кількома дослідниками [15–18]. Передбачають, що рівень адгезії поверхневих компонентів мікроорганізмів до епітеліальних клітин пов'язано з специфічною або неспецифічною адгезією між ними [12]. Так, протеолітичні ферменти скасовували адгезію *L. salivarius* UCC118, що дало змогу Dunne зі співавт [15] припустити залучення поверхневих білків до зазначеного процесу. Доведено, що вплив на адгезію мікроорганізмів також оказують білки S-шару, ліпотейхоєві кислоти, екзополісахариди, маннозо-специфічні адгезини тощо [12, 15]. На адгезію мікроорганізмів до різних поверхонь окрім біологічних чинників (склад клітинної стінки, наявність поверхневих структур, морфологія клітини тощо) також впливають і фізичні (заряд і структура матеріалу-мішені) [16, 17]. Передбачають, що механізм антиадгезивної дії мікробних речовин полягає в порушенні функції клітинної мембрани (підвищення її проникності) і зміні поверхневого заряду клітини [17, 18].

Наступними авторами досліджено вплив супернатанту культури *Lactobacillus rhamnosus* GG щодо профілактичного ефекту проти кишкової інфекції, викликаной *Escherichia coli* K1 [19]. Результати в тестах *in vitro* на клітинах Caco-2 показали блокування адгезії, інвазії і транслокації моношару *E. coli* K1-Caco-2 за допомогою біологічно активних речовин *L. rhamnosus* GG. В дослідях *in vivo* на моделі новонароджених щурів доведено, що попередня обробка речовинами лактобактерій значно знижує сприйнятливості тварин до пероральної інфекції



*E. coli* K1, що відображається у зменшенні бактеріальної кишкової колонізації, транслокації, розповсюдження інфекції. Новонароджені щури, до яких застосовували похідні *L. rhamnosus* GG мають нижчу бар'єрну проникність у порівнянні з тваринами без лікування. Представлені дані співпадають з попередніми власними результатами впливу метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG, одержаного культивуванням лактобактерій у власних дезінтергатах, на інфіковані полірезистентним штамом *Pseudomonas aeruginosa* рани (*in vivo*). За кількістю колонієутворюючих одиниць збудника в матеріалі інфікованих шкірних ран та динамікою змін планіметричних показників: площі загоєння, швидкості загоєння, коефіцієнту швидкості загоєння, репаративного ефекту ран після впливу метаболітного комплексу *L. rhamnosus* GG, одержаного культивуванням лактобактерій у власних дезінтергатах, доведена більша ефективність при профілактично-лікувальному застосуванні, яке передбачало додаткове безпосереднє нанесення метаболітного комплексу лактобактерій перед інфікуванням рани, у порівнянні з лікувальним випробуванням. Найбільш виражений ефект щодо коефіцієнту швидкості загоєння ран відносно контрольних зразків спостерігався при профілактично-лікувальному застосуванні ML: (в 3,25–3,4 разів;  $P=0,01$ ) на відміну від лікувального (в 2,05–2,25 разів;  $P=0,02$ ) на 5 добу експерименту.

Відмінності невисоких антиадгезивних властивостей біологічно активних речовин *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii* щодо інгібування стафілококу за тестами *in vitro* та обнадійливі результати їхнього профілактичного застосування в умовах *in vivo* можна пояснити, посилаючись на роботу Lebeer зі співавт [18]: адгезію бактерій (*in vivo*) важко спрогнозувати (*in vitro*) оскільки її можуть змінювати різні фактори (резидентна мікрофлора, молекули клітинних з'єднань тощо). Тільки адгезивних молекул відомо декілька сімейств [20]. Вони відрізняються за прикріпленням клітин одна до одної, до ендотелію або до екстрацелюлярного матриксу. Наприклад, SAMs (substrate adhesion molecules) – молекули адгезії до субстрату – сприяють адгезії до компонентів екстрацелюлярного (позаклітинного) матриксу за рахунок фокальних адгезійних контактів, CJM (cell junctional molecules) – молекули клітинних з'єднань – сприяють об'єднанні клітин у тканини завдяки формуванню щільних щілинних і адгезійних контактів, CAMs (cell-adhesion molecules) – молекули адгезії клітин (міжклітинні контакти) – клітинні білки адгезії, які розташовані на клітинній поверхні та беруть участь у зв'язуванні з іншими клітинами або з позаклітинним матриксом: допомагають клітинам прилипати один до одного та до їх оточення [20].

Що стосується дослідних метаболітних комплексів *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii*, однозначно стверджувати про відсутність чи наявність у них здатності впливати на адгезію збудників немає підстав, оскільки вони можуть мати інші можливості щодо даного процесу. Отже, представлені метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG і *S. boulardii*, незважаючи на незначний антиадгезивний вплив на *S. aureus* в умовах *in vitro*, володіють вираженими протимікробними, протибіоплівковими (на процес утворення та попередньо сформовані біоплівки) властивостями, синергічною активністю з антибіотиками за тестами *in vitro*, а також профілактично-лікувальною, лікувальною, ранозагоюючою, протимікробною поєднаною дією з антибіотиками в дослідженнях *in vivo* і є перспективними біологічно активними речовинами для конструювання поліфункціональних препаратів нового покоління.

#### Висновки

1. Отримані авторським способом метаболітні комплекси *L. rhamnosus* GG та *S. boulardii* володіють різним рівнем антиадгезивних властивостей відносно штаму *Staphylococcus aureus* 209-P за тестами *in vitro*.
2. Найбільш активними щодо інгібування адгезії бактеріальних клітин *S. aureus*, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів, були проби ML (на 17,19%,  $P=0,0005$ ) та LS (на 11,03%,  $P=0,006$ ).
3. Максимальне пригнічення адгезії мікробних клітин *S. aureus* до еритроцитів, оброблених метаболітними комплексами лактобактерій і сахароміцетів, також відбувалося під впливом зразків ML (на 14,9%,  $P=0,005$ ) та LS (на 12,98%,  $P=0,02$ ).
4. Незалежно від способу обробки (еритроцитів або клітин стафілококу) нижчими антиадгезивними властивостями серед всіх структурних компонентів та метаболітних комплексів володіли зразки L та MLS (на 4,12% - 5,63%).
5. Відсутність впливу на адгезію мікробних клітин *S. aureus* до еритроцитів спостерігалось при обробці стафілококу пробами MS та при обробці еритроцитів зразками S та MS.
6. Метаболітні комплекси *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* незважаючи на невисокі антиадгезивні властивості є біологічно активними речовинами з вираженою протимікробною, протибіоплівковою, синергічною з антибіотиками активністю, що робить їх перспективними компонентами для конструювання поліфункціональних препаратів.

**Перспективи подальших досліджень.** Планується провести біохімічний аналіз структурних компонентів та метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG і *Saccharomyces boulardii* та гел'хроматографічну характеристику їхніх окремих компонентів.

## References

1. Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. Escherichia coli Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science*. 2006; 313(5788): 848-51.
2. Cuevas-Ramos G, Isberg RR. Escherichia coli induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(25): 11537-42. doi: 10.1073/pnas.1001261107
3. Million M, Raoult D. Publication biases in probiotics. *Eur J Epidemiol*. 2012; 27(11): 885-6. doi: 10.1007/s10654-012-9740-4
4. Isayenko OY, Knysh OV, Babych YM, Ryzhkova TN, Dyukareva GI. Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria. *Regul Mech Biosyst*. 2019; 10(1): 3–8. [Ukrainian]. doi: 10.15421/021901
5. Isayenko OYu. Anti-diphtheria properties of structural-metabolites complexes of Lactobacteria and Saccharomyces probiotic strains. [Protydyferiyni vlastyvoosti strukturno-metabolitnykh kompleksiv probiotychnykh shtamiv laktobakteriy i sakharomitsetiv v testakh in vitro ta in vivo]. *Fiziol Zh*. 2019; 65(6): 51-60. [Ukrainian]. doi: 10.15407/fz65.06.051
6. Isayenko OY. Synergistic activity of filtrates *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* and antibacterial preparations against *Corynebacterium*. *Regul Mech Biosyst*. 2019; 10(4): 445–53. [Ukrainian]. doi: 10.15421/021968
7. Patent 123122 Ukraine, МПК: C12R 1/25, A61K 35/74, C12N 1/20, A61K 35/741. Method of producing metabolites of probiotic bacterial strains [Sposib oderzhannia metabolitov probioticheskikh shtammov bakterii] / Horbach TV, Isayenko OYu, Babych YeM, Kivva FV, Knysh OV, Balak OK. (UA); zayavnik i vlasnik patentu DU«IMI NAMN» (UA). № 123122; zayavl 04.09.17; opubl 12.02.18. Byul № 3. [Ukrainian]
8. Patent 126603 Ukraine. МПК: C12N 1/00, A61K 36/06, A61K 35/66. A method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria. [Sposib oderzhannia kombinatsii metabolitiv probiotichnykh shtamiv gribiv i bakterii] / Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Vashchenko V, Zachepyylo SV, Polyanska VP, Kovalenko OI, Balak OK. (UA); zayavnik i vlasnik patentu DU«IMI NAMN» (UA). № 126603; zayavl 05.02.18; opubl 25.06.18. Byul № 12. [Ukrainian]
9. Ivonin AG, Oborin VA. Development and prospects for application of the photometric method for determining the bacteriofixing activity of erythrocytes in veterinarianium. *Letters of the orenburg state agricultural university*. 2008; 3(19): 80–82. [Russian]
10. Pirog T, Grytsenko N, Konon A, Shevchuk T, Iutynska G. Antiadhesive potencial of Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017 biosurfactants. *Microbiol Zh*. 2014; 6(76): 9-16.
11. Iglesias MB, Viñas I, Colás-Medà P, Collazo C, Serrano JCE. Adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes* and interaction with *Lactobacillus rhamnosus* GG after habituation on fresh-cut pear. *J Funct Foods*. 2017; 34: 453-60. doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.011
12. Nantavisai K, Puttikamonkul S, Chotelersak K, Taweechoitpatr M. In vitro adhesion property and competition against enteropathogens of Lactobacillus strains isolated from Thai infants. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2018; 40 (1): 69-74. doi: 10.14456/sjst-psu.2018.14.
13. Zeraik AE, Nitschke M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. *Curr Microbiol*. 2010; 61(6): 554–59.
14. Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(12): 6366-71. doi: 10.1128/AAC.01180-12
15. Dunne C, Kelly P, O'Halloran S, Soden D, Bennett M, von Wright A, et al. Mechanisms of adherence of a probiotic Lactobacillus strain during and after in vivo assessment in ulcerative colitis patients. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2004; 16: 96-104.
16. Nitschke M, Araujo LV, Costa SG, Pires RC, Zeraik AE, Fernandes AC, et al. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 49(2): 241–47.
17. Kalyani R, Bishwambhar M, Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective. *Int Res J Pharm*. 2011; 2(8): 11–5.
18. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *MMBR*. 2008; 72(4): 728-64. doi: 10.1128/MMBR.00017-08
19. He X, Zeng Q, Puthiyakunnon S, Zeng Z, Yang W, Qiu J, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant enhance neonatal resistance to systemic *Escherichia coli* K1 infection by accelerating development of intestinal defense. *Sci Rep*. 2017; 7: 43305. doi: 10.1038/srep43305
20. Polishchuk LZ, Ryabtseva OD, Lukyanova NYu, Chekhun VF. Adhesion molecules and their importance in the development of malignant tumors. *Oncology*. 2011; 13(1): 4-11.

УДК 615.372:[615.331+615.339]:576.524

**АНТИАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ  
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG И SACCHAROMYCES BOULARDII  
В ТЕСТАХ IN VITRO**

**Исаенко Е. Ю., Кныш О. В., Минухин В. В.,  
Рыжкова Т. Н., Дюкарева Г. И.**

**Резюме.** Целью работы явилось изучение *in vitro* способности метаболитных комплексов *Lactobacillus rhamnosus* GG и *Saccharomyces boulardii*, полученных по авторской методике, влиять на адгезию микробных клеток для обоснования перспективности их использования при разработке новых полифункциональных препаратов.

Исследование *in vitro* адгезии бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* 209-P проводили после их обработки или обработки эритроцитов дезинтегратами (получены ультразвуковым облучением клеток *Lactobacillus rhamnosus* GG или *Saccharomyces boulardii*) и метаболитами (получены культивированием лактобактерий и сахаромецетов в собственных дезинтегратах, а их комбинация – в дезинтегратах лактобактерий). Наибольшее статистически достоверное ингибирование адгезии обработанных клеток *S. aureus* происходило метаболитами *L. rhamnosus*, полученными культивированием продуцентов в собственных структурных компонентах, (на 17,19%, P=0,0005) и метаболитами *S. boulardii*, полученными культивированием продуцентов в структурных компонентах *L. rhamnosus*, (на 11,03%, P=0,006). Максимальное подавление адгезии *S. aureus* при обработке эритроцитов также осуществлялось метаболитами *L. rhamnosus* (на 14,9%, P=0,005) и метаболитами *S. boulardii* (на 12,98%, P=0,02). Независимо от способа обработки (эритроцитов или клеток стафилококка) меньшими антиадгезивными свойствами обладали дезинтеграт лактобактерий и комбинация метаболитов *L. rhamnosus* и *S. boulardii* (на 4,12%-5,63%). Отсутствие подавления адгезии клеток возбудителя к эритроцитам отмечалась при обработке стафилококка метаболитами *S. boulardii*, полученными культивированием продуцентов в собственных структурных компонентах, а при обработке эритроцитов еще и дезинтегратом *S. boulardii*. Представленные результаты могут пригодиться при создании на основе метаболитных комплексов *Lactobacillus* и *Saccharomyces* противомикробных препаратов нового поколения.

**Ключевые слова:** адгезия, метаболиты, антиадгезивные свойства, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*.

UDC 615.372:[615.331+615.339]:576.524

**Anti-Adhesive Properties Metabolites Complexes of  
*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* in Tests *in vitro***

**Isayenko O. Yu., Knysh O. V., Minukhin V. V.,  
Ryzhkova T. N., Dyukareva G. I.**

**Abstract.** Along with the relevance of preventing the formation of biofilms, their damage, antimicrobial action on fungi and bacteria, especially antibiotic-resistant, it is important to find substances that can inhibit the adhesion process, since attachment of microbial cells of the pathogen to the biological object is the beginning of the development infectious process and primary stage of formation of biofilm of pathogens, which are much more complex to struggle than planktonic forms.

*The purpose of the work* is to study *in vitro* the ability of metabolites complexes of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*, obtained by the author's method, to influence the adhesion of microbial cells to substantiate the prospects of their use in the development of new multifunctional preparations.

*Material and methods.* The *in vitro* study of the adhesion of bacterial cells of *Staphylococcus aureus* 209-P was carried out after their treatment or treatment of erythrocytes with disintegrates (obtained by ultrasonic irradiation of cells of *Lactobacillus rhamnosus* GG or *Saccharomyces boulardii*) and metabolites (obtained by culturing lactobacteria and saccharomycetes in their own structural components).

*Results and discussion.* The highest statistically significant inhibition of adhesion of the treated *S. aureus* cells occurred with *L. rhamnosus* metabolites obtained by culturing producers in their own structural components (17.19%, P=0.0005) and *S. boulardii* metabolites obtained by culturing producers in structural components *L. rhamnosus* (11.03%, P=0.006). The maximum suppression of adhesion of *S. aureus* during the processing of erythrocytes was also carried out by metabolites of *L. rhamnosus* (by 14.9%, P=0.005) and metabolites of *S. boulardii* (by 12.98%, P=0.02). Regardless of the treatment method (erythrocytes or staphylococcus cells) less anti-adhesive properties had the disintegrate of lactobacteria and the combination of metabolites

*L. rhamnosus* and *S. boulardii* (by 4.12% - 5.63%). The absence of suppression of the adhesion of pathogen cells to erythrocytes was noted during the treatment of staphylococcus with metabolites of *S. boulardii*, obtained by culturing the producers in their own structural components, and during the processing of erythrocytes also by the disintegrate of *S. boulardii*.

*Conclusion.* The presented results can be useful when creating antimicrobial preparations new generation based on the metabolite complexes *Lactobacillus* and *Saccharomyces*.

**Keywords:** adhesion, metabolites, anti-adhesive properties, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii*.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 18.02.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування