

The method of bacteriological inoculation of wound discharge into aerobic and optional anaerobic microflora was used. Statistical processing of the study results was performed using Statistica v.6.1 software package (Statsoft Inc., USA).

**Results and discussion.** It has been found out that the structure of wound infection is dominated by gram-positive microorganisms of staphylococcus genus - 64.0% (48 patients). Non-fermentative gram-negative bacteria were detected in every fifth case - 20.0% (15 people), gram-negative bacteria of *Escherichia coli* group - in 9.3% of the cases (7 patients). There was not detected any flora growth in 5 (6.7%) cases. Significant differences were determined between the microflora of wounds with different etiology. According to the results of the study of the sensitivity of the microflora of wound secretion to antibacterial drugs it was established that staphylococci were most susceptible to the pharmacological groups of aminoglycosides (33.3%), glycopeptides (31.3); gram-negative bacteria of the group of *Escherichia coli* - to cephalosporins (42.9%) and antimicrobial agents (57.1%); non-fermentative gram-negative bacteria - to aminoglycosides (66.7%), cephalosporins (40.0%).

The use of adequate antibiotic therapy in complex treatment of chronic wounds led to positive results (wound closure) in 36 (48.0%) patients. In other cases (52.0%) a significant reduction in the area of the wound surface and the formation of marginal epithelialization of the wound were achieved.

**Conclusions.** 1. Significant differences between the microflora of chronic wounds with different etiology have been found out ( $p < 0.05$ ). 2. Gram-positive microorganisms have been most susceptible to amikacin and vancomycin. Gram-negative bacteria of *Escherichia coli* group are the most sensitive to phosphomycin and cefoperazone. And gram-negative bacteria are sensitive to amikacin (tobromycin) and also cefoperazone. 3. The best treatment results were obtained in wounds without bacterial contamination as well as in staphylococcal contamination of wounds ( $p < 0.05$  compared with that in *Escherichia coli* group (criterion  $\chi^2$ ). 4. There wasn't determined any significant dependence of treatment results on the etiological factor of wound formation ( $\chi^2 = 1,68$ ,  $p > 0,05$ ), indicating that all the wounds healed approximately equally in complex treatment with adequate antibacterial therapy.

**Key words:** chronic wounds, different etiology, microflora, antibiotic therapy.

Рецензент – проф. Білаш С. М.  
Стаття надійшла 27.02.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-1-155-145-148

УДК 615.33:[579.873.13+579.864.1]:579.222

<sup>1</sup>Книш О. В., <sup>2</sup>Пахомов О. В., <sup>1</sup>Погоріла М. С.

## СТРУКТУРНІ ТА МЕТАБОЛІТНІ ДЕРИВАТИ БЕЗКЛІТИННИХ ЕКСТРАКТІВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* І *LACTOBACILLUS REUTERI*

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут мікробіології та імунології

ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

knysh\_oksana@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дослідження є фрагментом НДР лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітичних комплексів лакто- та біфідопробіотиків», № державної реєстрації 0119U100686.

**Вступ.** Пробіотичним штамам *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri* притаманні корисні властивості, що сприяють зміцненню здоров'я людини [1,2]. Більшість корисних ефектів пробіотиків зумовлена дією їхніх структурних компонентів і продуктів метаболізму [3,4]. Ці різні за хімічною природою та походженням речовини і сполуки здатні впливати на експресію структурних і регуляторних генів як прокаріотичних, так і еукаріотичних клітин, координувати міжмікробну комунікацію і взаємодію мікроорганізмів з організмом хазяїна. Продукти метаболізму бактерій зазвичай отримують при культивуванні продуцента у рідкому поживному середовищі. Структурні компоненти бактерій можуть бути отримані шляхом застосування відомих способів дезінтеграції: хімічних, механічних, ферментативних, фізичних та комбінованих [5,6,7]. Руйнівні чинники, що відрізняються за природою та інтенсивністю, викликають різні за механізмом і глибиною пошкодження клітин. Тому отримані різними способами дезінтеграти від-

різняються за складом. Останній визначає характер біологічної активності та мету застосування.

Відомо, що бактерії більш стійкі до заморожування-відтавання, ніж еукаріотичні клітини. Для їх ефектної деструкції, як правило, необхідне багаторазове заморожування-відтавання (термоцикування), або його поєднання з іншими методами дезінтеграції (механічним подрібненням або ультразвуковою обробкою). В результаті термоцикування у позаклітинному середовищі опиняються не лише поверхневі та внутрішньоклітинні структури зруйнованих клітин, а й продукти метаболізму бактерій, що піддалися впливу холодового, дегідратаційного, регідратаційного, осмотичного видів шоку. Продукти перебудованого за шоким типом метаболізму є потужними регуляторами життєво важливих процесів в клітинах [8]. Попередніми дослідженнями встановлена висока біологічна активність фільтратів дезінтегратів *B. bifidum* та *L. reuteri*, отриманих термоцикуванням, і культур пробіотичних бактерій, одержаних при культивуванні у дезінтегратах власних клітин [9,10]. Для розуміння механізму біологічної активності необхідно вивчення біохімічного складу.

**Мета роботи** – дослідити біохімічний склад безклітинних екстрактів з отриманих термоцикуванням дезінтегратів та культур *B. bifidum* і *L. reuteri*, що культивувалися у дезінтегратах власних клітин.

**Таблиця 1 – Біохімічний склад безклітинних екстрактів**

№ п/п	Компонент, одиниці вимірювання	Вміст компонентів у безклітинних екстрактах (M ± σ)			
		L	ML	B	MB
1	pH	5,43 ± 0,1	4,12 ± 0,06	5,22 ± 0,08	4,39 ± 0,12
2	Молочна кислота, мМ/л	28,0 ± 2,6	57,2 ± 2,6	33,17 ± 2,0	51,0 ± 1,7
3	Гліцерол-тейхоєва кислота, мкг/мл	305,2 ± 1,7	309,2 ± 1,8	312,4 ± 1,7	324,2 ± 1,4
4	Рибітол-тейхоєва кислота, мкг/мл	30,3 ± 1,6	15,5 ± 0,9	21,2 ± 0,8	27,1 ± 0,9
5	ДНК, нг/мл	1,345 ± 0,06	0,2475 ± 0,002	1,255 ± 0,007	1,28 ± 0,004
6	РНК, нг/мл	2680 ± 0,007	400 ± 0,005	1362 ± 0,009	<20
7	Білок, мкг/мл	920 ± 60	1910 ± 75	860 ± 70	1735 ± 71

**Об'єкт і методи дослідження.** Для приготування безклітинних екстрактів використовували пробіотичні штами *B. bifidum* з препарату «Біфідумбактерин» (ТОВ «Віво-Актив», Україна) та *L. reuteri* DSM 17938 з препарату «БіоГая» (BioGaia Production AB, Швеція).

Методика отримання дезінтеграції та культур пробіотичних бактерій докладно описана раніше [10]. Досліджували біохімічний склад чотирьох безклітинних екстрактів: L – отриманий з фільтрованого дезінтеграції *L. reuteri*; ML – отриманий з фільтрованої культури *L. reuteri*, що культивувався у власному дезінтеграції; B – одержаний з фільтрованого дезінтеграції *B. bifidum*; MB – одержаний з фільтрованої культури *B. bifidum* аналогічно способу отримання екстракту ML.

Показники pH безклітинних екстрактів визначали за допомогою pH-метра- мілівольтметра pH-410 («НПКФ АКВИЛОН», РФ). Концентрацію молочної кислоти визначали ензиматично-колориметричним методом з використанням набору реагентів для визначення кількості лактату у біологічних рідинах «Лактат-01-Вітал» (ТОВ «Вітал діагностика», РФ) згідно інструкції виробника та спектрофотометра PV125-1 B. Вміст тейхоєвих кислот визначали за методом, описаним Baddiley та Davison [11]. Концентрацію виділених зі зразків ДНК та РНК визначали на флюориметрі Qubit® 3.0 Fluorometer («Invitrogen» Thermo Fisher Scientific) з використанням набору реагентів Qubit™ dsDNA HS Assay Kit та Qubit™ RNA HS Assay Kit («Invitrogen» Thermo Fisher Scientific, USA) згідно протоколів виробника. Концентрацію білка в зразках вимірювали за методом Lowry [12]. Дослідження молекулярно-масового розподілу пептидних фракцій безклітинних екстрактів проводили за допомогою високоефективної гель-проникної хроматографії згідно з методикою, описаною С.Є. Гальченко [13]. Вміст амінокислот визначали методом іонообмінної колонкової хроматографії на автоматичному амінокислотному аналізаторі AAA 339M («Мікротехна», Чехія) згідно міждержавного стандарту ISO 13903:

**Таблиця 2 – Склад білкового компоненту безклітинних екстрактів**

Фракція	Молекулярна маса, Да	Відносний вміст фракцій, %			
		L	ML	B	MB
Білки	≥ 12	3,1	2,7	4,8	2,8
Пептиди	≤ 12	96,9	97,3	95,2	97,2

2005 [14]. Визначення масової частки нітрогену за методом К'ельдаля та обчислення масової частки сирого протеїну з використанням блоку мінералізації і перегонки з водяною парою здійснювали у відповідності до міждержавного стандарту ISO 5983–1: 2005 [15].

Всі експерименти проводили тричі. Кожен зразок тестували в трьох повторях. Визначали середні значення отриманих показників зі стандартними відхиленнями. Отримані дані піддавали статистичній обробці за допомогою програмного забезпечення Excel 2010 (Microsoft, США). Значущість різниці між отриманими показниками визначали за критерієм Стюдента з поправкою Бонферроні. Відмінності між отриманими показниками вважали статистично значущими при  $P < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Як видно з представлених у таблиці 1 даних, показники pH екстрактів ML та MB були значно нижчими, ніж екстрактів L та B. Отже, в процесі культивування пробіотичних мікроорганізмів у дезінтеграції власних клітин відбувалося накопичення кислих продуктів метаболізму. Це підтвердили результати вимірювання концентрації молочної кислоти: вміст лактату в екстракті ML виявився у 2 рази вищим, ніж у екстракті L, а в екстракті MB – у 1,5 рази вищим, ніж у екстракті B (табл. 1). Низькі показники pH та відносно високий вміст молочної кислоти свідчать про потенційну протимікробну активність безклітинних екстрактів, особливо ML та MB.

Досліджені безклітинні екстракти також містили значну кількість тейхоєвих кислот (табл. 1), серед яких переважав гліцерол-тейхоєвий компонент. Відомо, що тейхоєві кислоти є одними з основних структурних компонентів клітинної стінки молочнокислих бактерій і відіграють важливу фізіологічну роль у взаємодії мікроорганізмів з організмом хазяїна та здатні модулювати імунну відповідь.

Концентрація ДНК у всіх досліджених екстрактах виявилася значно нижчою за достатню для стимуляції продукції цитокінів імунними клітинами (табл. 1). Але слід зазначити, що навіть за такої низької концентрації можлива реалізація імунотропної дії ДНК через модуляцію ефекту інших дериватів пробіотичних клітин. ML екстракт мав значно нижчий вміст ДНК, ніж решта екстрактів. Можлива причина такої різниці – ферментативний гідроліз ДНК під час культивування лактобактерій. Нуклеазна активність могла бути причиною також відносно низької концентрації РНК у екстрактах, отриманих шляхом культивування бактерій у дезінтеграції (екстракти ML і MB) (табл. 1).

Найвищий вміст білкового компоненту спостерігався у екстрактах ML і MB, що свідчило про наростання біомаси пробіотиків в процесі культивування у дезінтеграції власних клітин (табл. 1). Білки, що містяться в досліджених безклітинних екстрактах, потребують подальшої ідентифікації.

Якісний та кількісний склад білкового компоненту безклітинних екстрактів характеризувався значним переважанням низькомолекулярних фракцій (табл.

2). Відносний вміст пептидів (М.м.  $\leq 12$  кДа) був не значно вищим у екстрактах ML і MB, ніж у екстрактах L і B.

Вміст амінокислот виявився значно вищим у екстрактах ML та MB, ніж у екстрактах L та B. З них вільні амінокислоти складали від 10 % до 20,5 %. Найвищий вміст амінокислот у екстракті ML може свідчити про більшу продуктивність лактобактерій порівняно з біфідобактеріями за обраних умов дослідження. Концентрація азоту була теж значно вищою у екстрактах ML та MB порівняно з екстрактами L та B (табл. 3). При цьому значну частину азоту складав білковий азот.

**Висновки.** Білкові компоненти представлені переважно пептидами з молекулярною масою менше 12 кДа. Вміст білкових компонентів в екстрактах з культур пробіотиків значно вищий, ніж у екстрактах з дезінтеграції. Низькі показники рН (4,12 – 5,43) та

**Таблиця 3 – Вміст амінокислот та азоту в безклітинних екстрактах**

№	Компоненти, одиниці виміру	Вміст компонентів			
		L	ML	B	MB
1	Загальні амінокислоти, мг/100 мг	0,477	2,296	0,550	1,30
2	Вільні амінокислоти, мг/100 мг	0,098	0,346	0,056	0,13
3	Азот, %	0,082	0,381	0,096	0,218
4	Азот небілковий, %	0,021	0,069	0,017	0,031

висока концентрація молочної кислоти свідчать про потенційну протимікробну активність, а наявність тейхоевих та нуклеїнових кислот – про потенційну імунотропну активність досліджених екстрактів.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати спонукають до подальшого поглибленого вивчення біохімічного складу та імунобіологічних властивостей безклітинних екстрактів *B. bifidum* і *L. reuteri*.

## Література

- Mu Q, Tavella V, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:757. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00757
- Quigley EMM. *Bifidobacterium bifidum*. In Floch MH, Ringel Y, Walker WA, editors. *The microbiota in gastrointestinal pathophysiology: implications for human health, prebiotics, probiotics, and dysbiosis*. London: Academic Press; 2017. Part B, Chapter 14. P. 131-4. DOI: 10.1016/B978-0-12-804024-9.00008-2
- Caselli M, Vaira G, Girolamo C, Papini F, Holton J, Vaira D. Structural bacterial molecules as potential candidates for an evolution of the classical concept of probiotics. *Advances in Nutrition*. 2011;2:372-6. DOI: 10.3945/an.111.000604
- Singh A, Vishwakarma V, Singhal B. Metabiotics: the functional metabolic signatures of probiotics: current state-of-art and future research priorities. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2018;9:147-89. DOI: 10.4236/abb.2018.94012
- Bauer JA, Salvagni M, Vigroux JPL, Chalvet LLG, Chiavaroli C, inventors; Vifor Pharma (Switzerland), assignee. Immunomodulatory extracts from *Lactobacillus* bacteria and methods of manufacturing and use thereof. European patent 2540818-A1. 2013 Jan 2.
- Kapustian A, Chernov N, Stankevich G, Kolomiets I, Matsjuk O, Musiy L, Slyvka I. Determination of the enzyme destruction rational mode of biomass autolysate of lactic acid bacteria. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2018;1(1):1. DOI: 10.15587/1729-4061.2018.120877
- Vora A. Bacterial lysates. *RGUHS Journal of Medical Sciences*. 2016;6(3):110-1.
- Lindquist JA, Mertens PR. Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease. *Cell Communication and Signaling*. 2018;16(1):63. DOI: 10.1186/s12964-018-0274-6
- Knysh OV. Bifidogenic properties of cell-free extracts derived from probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019;10(1):124-8. DOI: 10.15421/021919
- Knysh OV, Isaenko OY, Babych EM, Kompaniets AM, Pakhomov OV, Polyanska VP, et al. Antimicrobial activity of bifidobacteria derivatives after storage in a frozen state. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2018;28(3):237-48. DOI: 10.15407/cryo28.03.237
- Baddiley J, Davison AL. The occurrence and location of teichoic acids in *Lactobacilli*. *Microbiology*. 1961;24(2):295-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193:265-75.
- Galchenko SE. Tissue and age specificity of aqueous-saline extracts from cryopreserved xenoorgans fragments. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2005;15(2):153-8.
- International Organization for Standardization (ISO). (2005). ISO 13903: 2005. Animal feeding stuffs—Determination of amino acids content. Available from: <https://www.iso.org/standard/37258.html>
- ISO 5983-1:2005 Animal Feeding Stuffs – Determination of Nitrogen Content and Calculation of Crude Protein Content – Part 1: Kjeldahl Method. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. Available from: <https://www.iso.org/standard/39145.html>

## СТРУКТУРНІ ТА МЕТАБОЛІТНІ ДЕРИВАТИ БЕЗКЛІТИННИХ ЕКСТРАКТІВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* І *LACTOBACILLUS REUTERI*

Книш О. В., Пахомов О. В., Погоріла М. С.

**Резюме.** Досліджено безклітинні екстракти, отримані шляхом дезінтеграції бактерій пробіотичних штамів *Lactobacillus reuteri* і *Bifidobacterium bifidum* або шляхом культивування відповідних бактерій у дезінтеграціях власних клітин. Встановлено, що білкові компоненти в екстрактах представлені переважно пептидами з молекулярною масою менше 12 кДа. Склад білкових компонентів в екстрактах виявився різним. Визначені концентрації тейхоевих, нуклеїнових та молочної кислот, низькі показники рН (4,12 – 5,43) свідчили про потенційну протимікробну та імунотропну активність екстрактів.

**Ключові слова:** безклітинні екстракти, білки, пептиди, тейхоеві кислоти, молочна кислота, ДНК, РНК.

## СТРУКТУРНЫЕ И МЕТАБОЛИТНЫЕ ДЕРИВАТЫ БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* И *LACTOBACILLUS REUTERI*

Кныш О. В., Пахомов О. В., Погорелая М. С.

**Резюме.** Исследованы бесклеточные экстракты, полученные путем дезинтеграции бактерий пробиотических штаммов *Lactobacillus reuteri* и *Bifidobacterium bifidum* или путем культивирования соответствующих бактерий в дезинтегратах собственных клеток. Установлено, что белковые компоненты в экстрактах представлены преимущественно пептидами с молекулярной массой менее 12 кДа. Состав белковых компонентов

в экстрактах оказался разным. Определенные концентрации тейхоевых, нуклеиновых и молочных кислот, низкие показатели pH (4,12 – 5,43) свидетельствовали о потенциальной противомикробной и иммуностропной активности экстрактов.

**Ключевые слова:** бесклеточные экстракты, белки, пептиды, тейхоевые кислоты, молочная кислота, ДНК, РНК.

### STRUCTURAL AND METABOLIC DERIVATIVES OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* AND *LACTOBACILLUS REUTERI* CELL-FREE EXTRACTS

Knysh O. V., Pakhomov O. V., Pogorila M. S.

**Abstract.** Probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* have beneficial properties that contribute to the promotion of human health. Most of the beneficial effects of probiotics are due to the action of their structural components and metabolic products. Bacterial metabolic products are usually obtained by cultivating the producer in a liquid nutrient medium. Structural components of bacteria can be obtained by applying various methods of disintegration: chemical, mechanical, enzymatic, physical and combined. Use of different in nature and intensity of destructive factors causes different in mechanism and depth of cell damage. Therefore, disintegrates obtained by various ways have different composition. This determines their various biological activity and purpose of application. It is known that bacteria are more resistant to freezing-thawing than eukaryotic cells. For their destruction, repeated freezing-thawing (thermal cycling) or combination with other disintegration methods is necessary. Preliminary studies have established the high biological activity of filtrates of *B. bifidum* and *L. reuteri* disintegrates, obtained by thermal cycling, and culture filtrates of these probiotics, cultured in disintegrates of their own cells.

*The aim of the study* was to investigate the biochemical composition of cell-free extracts obtained from disintegrates and cultures of *B. bifidum* and *L. reuteri* cultured in their own disintegrates.

*Methods.* Cell-free extracts were obtained by disintegration of *L. reuteri* and *B. bifidum* probiotic strains (L and B extracts) or by cultivation of these strains in their own disintegrates (ML and MB extracts). The pH values of the extracts, the content of protein, lactic, teichoic and amino acids, RNA and DNA were determined. The mass fraction of nitrogen by the Kjeldahl method was determined and the mass fraction of crude protein was calculated. Molecular weight distribution of peptide fractions of cell-free extracts was performed using high-performance gel permeation chromatography.

*Results.* The pH values of the ML and MB extracts were significantly lower than the corresponding values of the L and B extracts. This indicated that during the cultivation of probiotic microorganisms in their own disintegrates, an accumulation of acidic metabolic products was occurred. The results of measuring the concentration of lactic acid confirmed this: the lactate content in ML extract was 2 times higher than in L extract, and in MB extract 1.5 times higher than in B extract. All investigated cell-free extracts contained a significant amount of teichoic acids and a small amount of nucleic acids. The content of protein, peptides, amino acids and nitrogen in ML and MB extracts was significantly higher than in L and B extracts. ML extract was superior to the rest of these extracts in the quantitative content of proteins, peptides, nitrogen and free amino acids. The highest amino acid content in the ML extract indicate d a higher productivity of lactobacilli compared to bifidobacteria in the selected study conditions.

*Conclusion.* The protein components in the extracts are predominantly peptides with a molecular weight of less than 12 kDa. The content of protein components in extracts from cultures of probiotics is higher than in extracts from disintegrates. Teichoic, nucleic and lactic acids, low pH values (4,12 – 5,43) point to a potential antimicrobial and immunotropic activity of investigated extracts.

**Key words:** cell-free extracts, proteins, peptides, teichoic acids, lactic acid, DNA, RNA.

Рецензент – проф. Небесна З. М.

Статья надійшла 17.01.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-1-155-148-151

УДК 616.61-036.12-02

Лятифова Н. Ф.

### ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЗАБОЛЕВАНИИ ПОЧЕК У БОЛЬНЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Азербайджанский Медицинский Университет (г. Баку, Азербайджан)

nauchnayastatya@yandex.ru

**Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами.** Данная работа является фрагментом выполняемой диссертации на соискание ученой степени доктора философии по медицине «Некоторые патобиохимические свойства при диабетической нефропатии».

**Вступление.** Одним из наиболее распространенных осложнений у больных сахарным диабетом является хроническое заболевание почек (ХЗП). Согласно статистике последних лет, 15-40% пациентов

с МД 2 типа имеют ХЗП [1,2]. В целом, СД является одной из наиболее острых социальных и медицинских проблем современной медицины из-за широкого распространения эндокринологических заболеваний и тяжести клинических осложнений. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время в мире насчитывается около 415 миллионов случаев СД, и ожидается, что к 2040 году эта цифра достигнет 642 миллионов. Быстро растущая болезнь создает социальные и медицинские