

ultrastructure of microorganisms. Ultrathin sections were studied in a transmission electron microscope Hitachi 12 E and JEM-1400 at a voltage of 80-120 kV.

**Results.** In the period 2010-2018, a bacteriological study of faecal samples from 2121 children with OCI aged 0 to 18 years was conducted. Of these, in 1093 cases (51.5%), the OKI was etiologically established, and in 1028 cases (48.4%), the etiology was not established.

The revealed fact confirms the observations of modern researchers about the existence of «uncultivated» pathogens – possible real pathogens of the studied infectious process.

Our research on the results of diagnostics of OKI diseases on the territory of Azerbaijan has revealed a certain percentage of etiologically established pathology. But, along with this, a significant percentage of cases of the disease with an unknown etiology was also found. This fact is interpreted as a phenomenon associated with the presence of «uncultivated», «resting» cells of microorganisms that are not detected by classical bacteriological methods.

It seems necessary to expand and improve new diagnostic methods with the interpretation of the etiology of the infectious pathology under study, which is currently possible. Therefore, the purpose of our research was to determine the «uncultivated» pathogens when identifying inconsistencies with the OKI clinic of the isolated pathogen by the culture method. To this was applied the method of violetavolenta with the use of electron microscopy.

When comparing electron microscopy photos of the ultrastructure of bacteria detected by us from «secondary» cultures with photos from «Atlas» with the studied ultrastructures of microorganisms, it was found that the rod-shaped forms we isolated coincide with photos of *E. coli*, *Streptobacillus*, in «resting» forms and *Streptobacillus* in modified forms.

After exposure to bacteriophage, elements of microbial variability were detected: thickening of the capsule with uneven scalloped edges with erased pili, resembling the variability in the composition of biofilms.

It should be noted that along with the detected pathogens in the form of «resting» rod-shaped cells, the presence of other unexplored (unknown) pathogens has been determined to date, which suggests the need to isolate as many pathogens as possible from the body of a patient with OCI in order to detect the true pathogen of infection.

**Conclusions.** The established fact that there is a significant percentage of cases of OKI with unknown etiology suggests an expansion of the range of methods used to diagnose «uncultivated» pathogens that may be «true» pathogens of the infection under study.

**Key words:** «uncultivated» bacteria, favoritelist, persistence, acute intestinal infection.

Рецензент – проф. Небесна З. М.  
Стаття надійшла 17.04.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-236-240

УДК 615.372:[579.864.1+579.873.13]:577.352.38

<sup>1</sup>Книш О. В., <sup>2</sup>Нікітченко Ю. В.

## АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ БЕЗКЛІТИННИХ ЕКСТРАКТІВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* ТА *LACTOBACILLUS REUTERI* IN VITRO

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

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

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна (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.** Оксидативний стрес полягає в порушенні прооксидантно-антиоксидантного балансу в клітинах внаслідок підвищення продукції кисневих радикалів та зниження ефективності природних систем ферментативного і неферментативного антиоксидантного захисту. Оксидативний стрес призводить до пошкодження біологічних молекул і клітинних структур та лежить в основі патогенезу переважної більшості захворювань [1-4]. Включення антиоксидантів в комплексну терапію таких захворювань є патогенетично обґрунтованим. В процесі пошуку безпечних антиоксидантів природного походження увагу дослідників привернули пробіотики [1,4,5]. Деякі штами біфідо- і лактобактерій виявили здатність поглинати пероксидні, гідроксильні радикали і супероксидний аніон *in vitro*, підвищувати рівень

антиоксидантного захисту, зменшувати прояви і наслідки оксидативного стресу *in vivo* [4,5]. Механізми антиоксидантної активності пробіотиків активно досліджуються впродовж останнього десятиліття, але залишаються не до кінця вивченими. Антиоксидантну активність пробіотиків пов'язують зі здатністю хелатувати іони металів, продукувати власні антиоксидантні ферменти: (каталазу, супероксиддисмутазу) та антиоксидантні метаболіти (фолати, глутатіон), посилювати антиоксидантну активність та підвищувати рівень антиоксидантних метаболітів в організмі хазяїна, регулювати сигнальні шляхи, пригнічувати активність ферментів, що відповідають за продукцію активних форм кисню та регулювати склад і активність кишкової мікробіоти [4]. Однак для реалізації корисних ефектів пробіотиків необхідна колонізація ними слизових оболонок та приживлення в шлунково-кишковому тракті.

Недостатня ефективність клітинних пробіотиків внаслідок низького рівня приживлення та недостатня безпечність традиційної клітинної пробіотикотерапії, що не відповідає вимогам сучасної медицини,

диктують необхідність розробки альтернативних підходів до корекції мікроекологічних і метаболічних порушень. Одним з них є застосування біотехнологічних продуктів на основі біологічно активних похідних пробіотиків (структурних компонентів, метаболітів та сигнальних молекул) [6]. З ними пов'язують можливість уникнути недоліків клітинної пробіотикотерапії та швидко досягати прогнозованого ефекту.

Розроблений нами спосіб одержання безклітинних екстрактів (БКЕ) з пробіотичних штамів бактерій дозволяє отримати в кінцевому продукті суміш структурних компонентів і метаболітів пробіотиків без домішок поживного середовища [7]. Відомо, що властивості біотехнологічного продукту залежать від джерела та технології отримання, що визначають його компонентний склад. Технологічний процес обробки сировини повинен забезпечувати вихід її компонентів у кінцевий продукт з мінімальними втратами їх біологічної активності. Попередні дослідження встановили здатність отриманих розробленим способом БКЕ *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri* поглинати гідроксильні радикали в модельній системі їх генерації, яка перевищувала ефективність антирадикальної активності метабіотика Нулак® Forte [8]. Результати дослідження спонукали до продовження вивчення антиоксидантних властивостей зазначених БКЕ.

**Мета роботи** – дослідити *in vitro* антиокислювальну, глутатіонпероксидазну та каталазну активність БКЕ з отриманих термоциклюванням дезінтегратів та культур *B. bifidum* і *L. reuteri*, що культивувалися у дезінтегратах власних клітин.

**Об'єкт і методи дослідження.** БКЕ отримували з пробіотичних штамів *B. bifidum* 1 («Біфідумбактерин», ТОВ «Віво-Актив», Україна) та *L. reuteri* DSM 17938 («БіоГая», BioGaia Production AB, Швеція) за методикою, описаною раніше [7]. Досліджували антиоксидантну активність п'яти БКЕ: L – фільтрат дезінтеграту *L. reuteri*; ML – фільтрат культури *L. reuteri*, що культивувалася у власному дезінтеграті; MLG – фільтрат культури *L. reuteri*, що культивувалася у власному дезінтеграті з додаванням гліцерину (73,7 г/л) та глюкози (72,1 г/л); В – фільтрат дезінтеграту *B. bifidum*; МВ – фільтрат культури *B. bifidum*, що культивувалася у власному дезінтеграті. Препаратами порівняння було обрано метабіотик Нулак® Forte (HF, Ratiopharm, Німеччина) та відомий антиоксидант  $\alpha$ -токоферол (ICN, США).

Антиокислювальну активність (АОА) БКЕ, метабіотика HF та  $\alpha$ -токоферолу досліджували за модифікованим методом Клебанова зі співавторами [9]. Суспензію жовткових ліпопротеїдів (СЖЛП) отримували гомогенізацією жовтка курячого яйця та фосфатного буфера (ФБ: 40 мМ  $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 105 мМ КСІ, рН 7,45) в рівних об'ємах. Перед використанням СЖЛП розводили 1:24 тим же буфером. До 0,2 мл СЖЛП додавали 20-170 мкл БКЕ або препарату порівняння, 0,530-0,680 мл ФБ. Перекисне окислення ліпідів у зразках ініціювали додаванням 0,1 мл 25 мМ розчину  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , приготованого перед використанням. Контрольний зразок не містив БКЕ або препарату порівняння. Нульовий зразок містив ФБ та  $\text{Fe}^{2+}$ . Зразки інкубували при 37 °С та інтенсивному перемішуванні впродовж 15 хв. Після інкубації до зразка додавали 0,5 мл 20 % трихлороцтової кислоти та 20 мкл  $10^{-2}$  М

розчину антиоксиданту іонолу в етанолі. Вміст пробірок перемішували і центрифугували 15 хвилин при 900 g. До отриманого супернатанту додавали 1 мл ТБК-реагента (0,5 % тіобарбітурової кислоти і 0,3 % додецилсульфату натрію). Суміш витримували на киплячій водяній бані впродовж 15 хв. Після охолодження зразки піддавали спектрофотометрії при довжині хвилі 532 нм на двопробному спектрофотометрі «Specord UV VIS» (Jena, Німеччина). АОА дослідних зразків розраховували за формулою:  $\text{АОА} = \frac{\Delta\text{Dк} - \Delta\text{Dд}}{\Delta\text{Dк}} \times 100 \%$ , де  $\Delta\text{Dк}$  та  $\Delta\text{Dд}$  різниця між оптичною густиною дослідних і контрольних зразків до та після 15 хв інкубації. Отримані результати виражали у мкл/мл та в мг/мл реакційного середовища. Масу сухого залишку визначали шляхом висушування екстрактів при 105 °С впродовж 30 хв.

Глутатіонпероксидазну активність (ГП, GPx, КФ 1.11.1.9) визначали в реакційному середовищі, що містило 50 мМ К-На-ФБ (рН 7,4), 1 мМ ЕДТА, 0,15 мМ НАДФН, 1 мМ відновленого глутатіону, 0,2 % тритону X-100, 3 мМ азиду натрію, 1 Од/мл глутатіонредуктази, 0,4 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  за методом [10]. Досліджувані БКЕ або метабіотик HF додавали в концентрації 50, 100 та 200 мкл на 1 мл реакційного середовища. Реакцію проводили при 37 °С та постійному перемішуванні. ГП-активність реєстрували при 340 нм. Активність виражали в нмоль НАДФН/хв на 1 мл БКЕ або метабіотика HF з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Каталазну активність (КАТ, КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали за утилізацією  $\text{H}_2\text{O}_2$  в реакційному середовищі, що містило 10 мМ К-ФБ (рН 7,4), 0,1 мМ ЕДТА, 15 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 50, 100 або 200 мкл БКЕ або метабіотика HF на 1 мл реакційного середовища при 240 нм та температурі 37 °С спектрофотометричним методом [11]. Активність виражали в нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /хв на 1 мл БКЕ або метабіотика HF з урахуванням коефіцієнту молярної екстинкції для  $\text{H}_2\text{O}_2$   $39,4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Експерименти проводили чотири-шість разів. Отримані дані виражали як середні арифметичні зі стандартним відхиленням ( $x \pm \text{SD}$ ), піддавали статистичній обробці з використанням програми Microsoft Excel 2003. Проводили однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з наступним множинним порівнянням із застосуванням корекції Бонферроні.

**Результати дослідження та їх обговорення.** На рис. 1 представлені результати дослідження АОА БКЕ з дезінтеграту та культур *L. reuteri*. Вони показують, що серед них екстракт ML володіє найнижчою

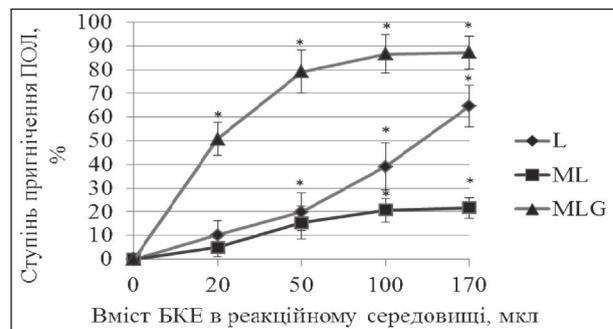


Рисунок 1 – Вплив БКЕ *L. reuteri* на інтенсивність індукованого ПОЛ у модельній системі.

Примітка: \* – різниця достовірна відносно показника в контрольному зразку,  $p < 0,05$ .

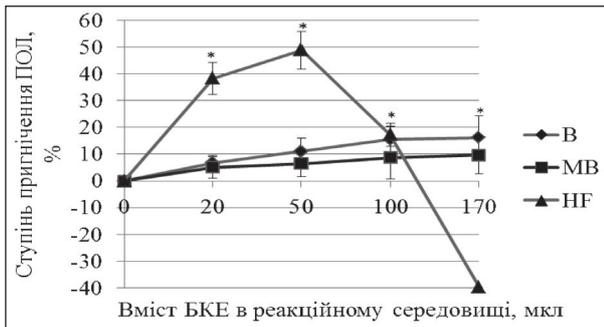


Рисунок 2 – Вплив БКЕ *B. bifidum* та метабіотика НФ на інтенсивність індукованого ПОЛ у модельній системі.

Примітка: \* – різниця достовірна відносно показника в контрольному зразку,  $p < 0,05$ .

АОА. За 17 об.% концентрації цього екстракту у модельній системі спостерігалось зменшення вмісту ТБК-активних продуктів лише на  $21,7 \pm 6$  %. Екстракт L виявив більш значний вплив на процеси ПОЛ у модельній системі. 50 % пригнічення ПОЛ він спричиняв за 13 об.% вмісту у реакційному середовищі. Найвищу АОА показав екстракт MLG. Інтенсивність ПОЛ знижувалася на 50 % за його вмісту у модельній системі 2 об.%.

Результати дослідження, подані на рис. 2, свідчать, що БКЕ з дезінтеграту та культури *B. bifidum* виявили низьку (В) або незначну (МВ) АОА. Екстракт В за вмісту в реакційному середовищі 17 об.% забезпечував зниження інтенсивності ПОЛ лише на  $16,2 \pm 8$  %. Інтенсивність ПОЛ за вмісту у модельній системі екстракту МВ у концентрації 17 об.% істотно не відрізнялася від відповідного показника в контрольному зразку, що не містив БКЕ ( $p \geq 0,05$ ). Метабіотик НФ 50% пригнічення ПОЛ спричиняв за концентрації в реакційному середовищі 5 об.%. Але подальше збільшення вмісту метабіотика НФ супроводжувалося зменшенням антиокислювального ефекту. А за концентрації метабіотика НФ в реакційному середовищі 17 об.% спостерігалось підвищення інтенсивності ПОЛ на  $39,7 \pm 5$  %, що може бути пов'язане з присутністю в препараті метаболітів, здатних при підвищенні концентрації у модельній системі виявляти прооксидантний ефект.

Відомий ефективний антиоксидант  $\alpha$ -токоферол забезпечував 50 % пригнічення ПОЛ за концентрації у реакційному середовищі 8 мг/мл. Досліджувані БКЕ L і MLG та метабіотик НФ пригнічували інтенсивність ПОЛ на 50 % за концентрації в реакційному середовищі 1,4 мг/мл, 2,4 мг/мл та 7,4 мг/мл, відповідно (з врахуванням маси сухого залишку, отриманого шляхом висушування екстрактів та метабіотика НФ при 105 °C впродовж 30 хв). Отже, АОА БКЕ L та MLG відповідала рівню АОА препаратів порівняння. Слід зазначити, що БКЕ з дезінтеграту та культури *B. bifidum* характеризувалися дещо меншим вмістом сухого залишку на 100 мкл екстракту: 0,93 мг (В) та 0,85мг (МВ), ніж екстракти L (1 мг), ML (1,2 мг) та MLG (11,8 мг). Але цим не можна було пояснити їх низьку антиокислювальну активність. Так, за концентрації, що забезпечувала 50 % пригнічення ПОЛ в модельній системі екстрактом L (1,4 мг/мл), екстракт В спричиняв низький рівень (~ 16 %), а екстракт МВ – незначне (~ 7 %) пригнічення інтенсивності ПОЛ. Але екстракт ML, який містив більше сухого залишку, ніж

екстракт L, за тієї ж концентрації (1,4 мг/мл) теж викликав слабе пригнічення інтенсивності ПОЛ (на ~ 20 %).

Очевидно, різний характер впливу досліджених екстрактів на процеси ПОЛ зумовлений різними способами їх отримання, які визначають відмінності компонентного складу. Екстракт L – це фільтрат отриманого багаторазовим термоциклюванням дезінтеграту. Дезінтеграція призводила до вивільнення з клітин, що піддавалися впливу холодового, осмотичного стресу та механічному руйнуванню кристалами льоду, структурних компонентів і продуктів перебудованого за шоким типом метаболітів. Екстракт ML містив переважно метаболіти клітин, що культивувалися у власних дезінтегратах. Можливі механізми антиоксидантної активності зазначених екстрактів – здатність хелатувати іони  $Fe^{2+}$ . Чинники, відповідальні за хелатування пробіотиками іонів металів, недостатньо вивчені, але виявлено, що фізіологічні хелатори можуть бути присутніми у екстрактах з пробіотичних бактерій [4]. Здатність пригнічувати процеси ПОЛ може бути спричинена наявністю у складі БКЕ антиоксидантних метаболітів, наприклад, лактату. Groussard зі співавторами в експериментах *in vitro* показали, що лактат-іон здатен поглинати  $O_2^{-i}$ -ОН радикали та пригнічувати процеси ПОЛ у культурі гепатоцитів [12]. АОА екстракту L виявилася значно вищою, ніж екстракту ML, який містить удвічі вищу концентрацію молочної кислоти [13]. Отже, внесок лактату в АОА екстрактів не є визначальним.

Секвенування геному *L. reuteri* ATCC 55730 (материнського штаму) виявило у його складі гени, що відповідають за синтез глутатіону, фолату і ферментів, здатних протидіяти АФК: метионінсульфоксидредуктази, пероксиредоксину, пероксидази, тіолпероксидази та глутатіондисульфідредуктази а також відсутність генів, що кодують КАТ і супероксиддисмутазу [14,15]. Тому відсутність КАТ-активності дослідних БКЕ *L. reuteri* була очікуваною. БКЕ та метабіотик НФ за вмісту в реакційному середовищі до 200 мкл/мл не виявляли ГП-активності. В нашому дослідженні також не виявлено КАТ-активності БКЕ та метабіотика НФ за вмісту в реакційному середовищі до 200 мкл/мл.

Екстракт MLG показав найвищу АОА серед усіх досліджених БКЕ. Він був отриманий з культури *L. reuteri*, що культивувалася у дезінтегратах з додаванням гліцерину і глюкози. Відомо, що *L. reuteri* в результаті ферментації гліцерину за участю ферменту кобаламін-залежної гліцерол-дегідратази в анаеробних умовах продукує реутерин, який володіє широким спектром протимікробної активності [16]. Реутерин є проміжним продуктом перетворення гліцерину в 1,3-пропандіол і являє собою складну динамічну трикомпонентну систему з 3-гідроксипропіональдегід-мономеру, його гідратованої та циклічної димерної форми. Може піддаватися зворотній дегідратації з утворенням акролеїну або в результаті альдегідної дисмутації за участі гліцерол-оксидоредуктази перетворюватися на 1,3-пропандіол [17]. Очевидно, із вмістом зазначених речовин пов'язана значна АОА екстракту MLG.

Біфідобактерії є облигатними анаеробами, у яких низька або відсутня активність ферментів антиоксидантного захисту – КАТ та супероксиддисмутази (за

винятком *B. adolescentis*). Для захисту від  $O_2$  біфідобактерії використовують НАДН оксидазу та НАДН пероксидазу. У біфідобактерій також не виявлено гену ГП та шляхів синтезу глутатіону [18]. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури: БКЕ *B. bifidum* за вмісту в реакційному середовищі до 200 мкл/мл не виявили ГП- та КАТ-активності. За даними літератури, штами *B. bifidum* продукують у великій кількості неферментативні антиоксиданти – фолати [19]. Дослідження вмісту фолатів у БКЕ *B. bifidum* та *L. reuteri* нами не проводилося. Низька АОА БКЕ або її відсутність *in vitro* не виключає наявності у них непрямой АОА, яка полягає в залученні механізмів впливу на прооксидантно-антиоксидантний баланс *in vivo*.

**Висновки.** АОА екстрактів з дезінтеграту (L) та культури *L. reuteri*, що культивувалася у власному дезінтеграті з додаванням гліцерину і глюкози (MLG), відповідає рівню АОА відомого антиоксиданта  $\alpha$ -токоферолу та метабіотика HF. Екстракти з дезінтеграту *B. bifidum* (B) та культур *B. bifidum* (MB) і *L. reuteri* (ML), що культивувалися у власних дезінтегратах, володіють низькою або незначною АОА. За умов експерименту жоден з екстрактів та метабіотик HF не виявили КАТ- та ГП-активності.

**Перспективи подальших досліджень.** З метою з'ясування механізмів біологічної активності та обґрунтування доцільності терапевтичного застосування БКЕ *L. reuteri* та *B. bifidum* планується подальше вивчення їх антиоксидантних властивостей за здатністю поглинати NO- та пероксинітритний радикали.

### Література

- Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012 Jul 12;97(2):809-17. DOI: 10.1007/s00253-012-4241-7
- Borra SK. Effect of curcumin against oxidation of biomolecules by hydroxyl radicals. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 Oct;8(10):CC01-CC05. DOI: 10.7860/jcdr/2014/8517.4967
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018 Apr;13:757-72. DOI: 10.2147/cia.s158513
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*. 2017 May 19;9(5):521. DOI: 10.3390/nu9050521
- Mishra V, Shah C, Mokashe N, Chavan R, Yadav H, Prajapati J. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015 Apr 6;63(14):3615-26. DOI: 10.1021/jf506326t
- Shenderov BA, Tkachenko Yel, Zakharchenko MM, Sinitsa AV. Metabiotiki: perspektivy, vyzovy i vozmozhnosti. *Meditsynskiy alfavit*. 2019;2(13):43-8. DOI: 10.33667/2078-5631-2019-2-13(388)-43-48. [in Russian].
- Knysh OV, Isaenko Olu, Babych YeM, Polianska VP, Zachepylo SV, Kompaniiets AM, Horbach TV, vynakhidnyky; Derzhavna ustanova «Instytut mikrobiologii ta imunologii im. I. I. Mechnykova Natsionalnoi akademii medychnykh nauk Ukrainy», patentovlasnyk. Metod oderzhannia biolohichno aktyvnykh deryvativ bakterii probiotychnykh shtamiv. Patent Ukrainy na korysnu model № 122859. 2018 Sich 25. [in Ukrainian].
- Knysh OV, Nikitchenko YuV. In vitro antyradikalna aktyvnist bezklytynnykh ekstraktiv Bifidobacterium bifidum ta Lactobacillus reuteri. Aktualni problemy suchasnoi medytsyny: Visnyk Ukrainskoi medychnoi stomatolohichnoi akademii. 2020;20(1):140-4. DOI: 10.31718/2077-1096.20.1.140 [in Ukrainian].
- Klebanov GI, Babenkova IV, Teselkin YuO, Komarov OS, Vladimirov YuA. Otsenka antiokislitelnoy aktivnosti plazmyi krovi s primeneniem zheletochnykh lipoproteidov. *Laboratornoe delo*. 1988;5:59-62. [in Russian].
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1967;70(1):158-69.
- Aebi H. [13] Catalase in vitro. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1984. p. 121-6.
- Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of applied physiology*. 2000;89(1):169-75. DOI: 10.1152/jappl.2000.89.1.169
- Knysh OV, Pakhomov OV, Pohorila MS. Strukturni ta metabolitni deryvaty bezklytynnykh ekstraktiv Bifidobacterium bifidum i Lactobacillus reuteri. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2020;1(155):145-8. DOI: 10.29254/2077-4214-2020-1-155-145-148 [in Ukrainian].
- Basu Thakur P, Long AR, Nelson BJ, Kumar R, Rosenberg AF, Gray MJ. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *mSystems*. 2019 Sep 3;4(5):e00453-19. DOI: 10.1128/mSystems.00453-19
- Saunier DM, Santos F, Roos S, Mistretta TA, Spinler JK, Molenaar D, et al. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS One*. 2011;6:e18783. DOI: 10.1371/journal.pone.0018783
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*. 2007;7(1):101. DOI: 10.1186/1471-2180-7-101
- Rütti DP. Biotechnological production of antimicrobial 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol using free and immobilised *Lactobacillus reuteri* cells and its reactive extraction. 2010. Doctoral dissertation, ETH Zurich.
- He J, Sakaguchi K, Suzuki T. Acquired tolerance to oxidative stress in *Bifidobacterium longum* 105-A via expression of a catalase gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012 Feb 3;78(8):2988-90. DOI: 10.1128/aem.07093-11
- Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*. 2011 Jan 18;3(1):118-34. DOI: 10.3390/nu3010118

### АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ БЕЗКЛІТИННИХ ЕКСТРАКТІВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* ТА *LACTOBACILLUS REUTERI IN VITRO*

Книш О. В., Нікітченко Ю. В.

**Резюме.** Досліджено здатність безклітинних екстрактів (БКЕ) з бактерій пробіотичних штамів *Lactobacillus reuteri* і *Bifidobacterium bifidum* впливати на індуковане іонами заліза перекисне окислення ліпідів (ПОЛ) в модельній системі з жовтковими ліпопротеїдами. Встановлено, що БКЕ з дезінтеграту (L) та культури лактобактерій, що культивувалася у власному дезінтеграті з додаванням 73,7 г/л гліцерину та 72,1 г/л глюкози (MLG), володіють значною антиокислювальною активністю (АОА). 50 % пригнічення ними інтенсивності процесів ПОЛ спостерігалось за вмісту у реакційному середовищі 1,4 мг/мл (L) та 2,4 мг/мл (MLG). АОА екстрактів L та MLG була на рівні АОА відомого антиоксиданта  $\alpha$ -токоферолу та метабіотика Hylak® Forte (HF). Решта БКЕ: з дезінтеграту біфідобактерій (B), культур лактобактерій (ML) та біфідобактерій (MB), що культивувалися у дезінтегратах власних клітин, показали низьку або незначну здатність впливати на процеси ПОЛ в модельній системі. За умов експерименту жоден з БКЕ та метабіотик HF не виявили каталазної та глутатіонпероксидазної активності.

**Ключові слова:** пробіотики, безклітинні екстракти (БКЕ), індукване перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантна активність (АОА).

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* И *LACTOBACILLUS REUTERI* IN VITRO

Кныш О. В., Никитченко Ю. В.

**Резюме.** Исследована способность бесклеточных экстрактов (БКЭ) из бактерий пробиотических штаммов *Lactobacillus reuteri* и *Bifidobacterium bifidum* влиять на индуцированное ионами железа перекисное окисление липидов (ПОЛ) в модельной системе с желточными липопротеидами. Установлено, что БКЭ из дезинтеграта (L) и культуры лактобактерий, которая культивировалась в собственном дезинтеграте с добавлением 73,7 г/л глицерина и 72,1 г/л глюкозы (MLG), обладают значительной антиокислительной активностью (АОА). 50 % ингибирование ими интенсивности процессов ПОЛ наблюдалось при содержании в реакционной среде 1,4 мг/мл (L) и 2,4 мг/мл (MLG). АОА экстрактов L и MLG была на уровне АОА известного антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола и метабиотика Hylak® Forte (HF). Остальные БКЭ: из дезинтеграта бифидобактерий (B), культур лактобактерий (ML) и бифидобактерий (MB), которые культивировались в дезинтегратах собственных клеток, показали низкую или незначительную способность влиять на процессы ПОЛ в модельной системе. В условиях эксперимента ни один из БКЭ и метабиотик HF не проявили каталазной и глутатионпероксидазной активности.

**Ключевые слова:** пробиотики, бесклеточные экстракты (БКЭ), индуцированное перекисное окисление липидов (ПОЛ), антиоксидантная активность (АОА).

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* AND *LACTOBACILLUS REUTERI* CELL-FREE EXTRACTS IN VITRO

Knysh O. V., Nikitchenko Yu. V.

**Abstract.** Some probiotic bacteria possess antioxidant activity (AOA). This is due to their ability to chelate metal ions, produce their own antioxidant enzymes and metabolites, enhance AOA and increase the level of antioxidant metabolites in the host, regulate signaling pathways, suppress the activity of enzymes responsible for the production of reactive oxygen species and regulate the composition and activity of the intestinal microbiota. However, the realization of the beneficial effects of probiotics requires colonization of mucous membranes by them and engraftment in the gastrointestinal tract. Low levels of engraftment and insufficient safety of cellular probiotics require the use of alternative approaches to probiotic therapy. One is the use of biotechnological products based on biologically active derivatives of probiotics. Our method of obtaining cell-free extracts (CFEs) from probiotic bacteria allows obtaining in the final product a mixture of structural components and metabolites of probiotics without impurities of a nutrient medium. Their biological properties need careful study. In our previous studies *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* CFEs showed antiradical activity with respect to the most reactive hydroxyl radical which exceeded the same activity of the metabiotic Hylak® Forte.

*The aim of the study* was to investigate the antioxidant, glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activity of CFEs obtained from disintegrates and cultures of *B. bifidum* and *L. reuteri* cultured in their own disintegrates with or without supplementation.

*Methods.* CFEs 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 without supplementation (ML and MB extracts) and supplemented with 73,7 g/l glycerol and 72,1 g/l glucose (MLG extract). Metabiotic Hylak® Forte (HF, Ratiopharm, Germany) and the well-known antioxidant  $\alpha$ -tocopherol (ICN, USA) were selected as the comparative preparations. The AOA of CFEs, metabiotic HF and  $\alpha$ -tocopherol in the model system with yolk lipoproteins as well as CAT- and GPx-activity of CFEs and metabiotic HF were investigated by spectrophotometric method using double beam spectrophotometer «Specord UV VIS» (Jena, Germany).

*Results.* It was found out that CFEs from disintegrate (L) and culture of lactobacilli (MLG), cultivated in its own disintegrate supplemented with glycerol (73.7 g/l) and glucose (72.1 g/l) have significant AOA. They provided 50% inhibition of the induced lipid peroxidation (LP) intensity at a concentration of 1.4 mg/ml (L) and 2.4 mg/ml (MLG) in the reaction medium.  $\alpha$ -Tocopherol and metabiotic HF reduced the induced LP intensity in the model system by 50% when contained in the reaction medium 8 mg/ml and 7.4 mg/ml, respectively. Extract B at a concentration of 17 %vol. (1.6 mg/ml) in the reaction medium provided a decrease of the induced LP intensity by only 16.2  $\pm$  8 %. The induced LP intensity in the model system at content of MB extract 17 %vol. (1.5 mg/ml) did not significantly differ from the corresponding indicator in the control sample (without CFEs). Neither the CAT- nor GPx-activity of the studied CFEs and the metabiotic HF were detected at their content in the reaction medium up to 200  $\mu$ /ml.

*Conclusion.* The AOA of the CFEs from the *L. reuteri* disintegrate (L) and culture, cultivated in its own disintegrate supplemented with glycerol and glucose (MLG), corresponded to the level of AOA of the well-known antioxidant  $\alpha$ -tocopherol and the metabiotic HF. Extracts from *B. bifidum* disintegrate (B) and cultures of *B. bifidum* and *L. reuteri* cultivated in their own disintegrates (MB and ML, respectively) had low or insignificant AOA. Under the experimental conditions none of the CFEs and metabiotic HF showed CAT- and GPx-activity.

**Key words:** probiotics, cell-free extracts (CFEs), induced lipid peroxidation (LP), antioxidant activity (AOA).

Рецензент – проф. Небесна З. М.

Стаття надійшла 03.03.2020 року