APPLICATION EFFICIENCY OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM 1 AND LACTOBACILLUS REUTERI DSM 17938 CELL-FREE EXTRACTS IN VIVO

Knysh Oksana,
Senior researcher, Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, laboratory of respiratory infections prevention, Ukraine, Kharkiv, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4105-1299
Pogorila Marina,
Senior researcher, Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, laboratory and clinical department of molecular immunopharmacology, Ukraine, Kharkiv, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-1783-9772
Polianska Valentina,
Assistant Professor, Ukrainian Medical Stomatological Academy, microbiology, virology and immunology department, Ukraine, Poltava, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-8727-9029
Zachepylo Svitlana,
Assistant Professor, Ukrainian Medical Stomatological Academy, otorhinolaryngology with ophthalmology department, Ukraine, Poltava, ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-2194-0611

DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_sr/30062020/7137

ARTICLE INFO

Received 21 April 2020
Accepted 08 June 2020
Published 30 June 2020

KEYWORDS

probiotic cell-free extracts,
Bifidobacterium bifidum 1,
Lactobacillus reuteri DSM 17938,
antibiotic-induced dysbiosis,
murine model of intestinal staphylococcal infection.

ABSTRACT

Insufficient efficiency and safety of cellular probiotics encourages the search for new effective means of correction of microecological disorders. Most of the beneficial effects of probiotics are due to the biological activity of their structural components and metabolites. Recently, great hope is pinned on postbiotic products as a means of restoring the balance of intestinal microbial populations. The data obtained in this experimental study demonstrate the ability of cell-free extracts from Bifidobacterium bifidum 1 and Lactobacillus reuteri DSM 17938 cultures, cultivated in their own disintegrates supplemented with ascorbic acid, to provide anti-infection protection and correct microecological disturbances at modeling an infectious process against a background of antibiotic-induced dysbiosis in mice. The beneficial effects of cell-free extracts showed up in the acceleration of the pathogen elimination and an increase in the number of representatives of the positive intestinal microbiota. The results of the study justify the need for further clinical trials to determine the therapeutic efficacy of cell-free extracts when included in the protocols of dysbiosis treatment.

Citation: Knysh Oksana, Pogorila Marina, Polianska Valentina, Zachepylo Svitlana. (2020) Application Efficiency of Bifidobacterium Bifidum 1 and Lactobacillus Reuteri DSM 17938 Cell-Free Extracts in Vivo. *Science Review*. 5(32). doi: 10.31435/rsglobal_sr/30062020/7137

Copyright: © 2020 **Knysh Oksana, Pogorila Marina, Polianska Valentina, Zachepylo Svitlana.** This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Робота є фрагментом НДР «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітних комплексів лакто- та біфідо-пробіотиків» 0119U100686.

Вступ. Поширеність дисбактеріозів серед населення Східної Європи сягає 90% [1]. До найбільш частих причин розвитку кишкового дисбіозу належать інфекції, вживання ліків та незбалансована дієта [2, 3]. Особливе значення має нераціональне застосування антибіотиків, яке сприяє не лише поширенню антибіотик-асоційованих дисбактеріозів серед населення, але й

формуванню у мікроорганізмів стійкості до антибіотиків [4]. Збільшення кількості резистентних до антимікробних засобів штамів призводить до зростання захворюваності та смертності від інфекційних захворювань [5].

Основні мікробіологічні ознаки дисбіозу: зменшення кількості корисних бактерій (*Bacteroides, Bifidobacterium, Lactobacillus* та ін.), експансія патобіонтів (*Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcus* та ін.), зменшення мікробного різноманіття та порушення мікробного метаболізму [3, 6]. Мікроекологічний дисбаланс супроводжується порушеннями механізмів вродженого та адаптивного імунного захисту, розвитком запалення в слизовій оболонці кишечника з активацією процесів оксидації, ослабленням і підвищеною проникністю кишкового бар'єру для продуктів запалення, мікробних токсинів, підвищенням ризику мікробної транслокації та метаболічними змінами запального характеру [6]. Зазначені події є важливою патогенетичною ланкою розвитку не лише запальних захворювань кишечника, а й метаболічних (діабету та ожиріння), алергічних, автоімунних, серцево-судинних, нейродегенеративних, ракових та інших захворювань [7]. Недостатня ефективність, безпечність та складність існуючих методів корекції мікроекологічних порушень робить необхідним продовження пошуку нових ефективних засобів. Більшість сприятливих ефектів пробіотиків обумовлені біологічною активністю їх структурних компонентів та продуктів обміну [8, 9]. Тому в останні роки великі сподівання покладаються на постбіотичні продукти як засоби відновлення балансу мікробних популяцій кишечника, запобігання і лікування інфекцій шляхом збільшення колонізації слизових оболонок корисними для здоров'я коменсальними видами бактерій та посилення захисних властивостей імунної системи. А пробіотичні бактерії розглядають як цінне джерело біологічно активних дериватів [10, 11].

Для налагодження промислового виробництва постбіотичних засобів необхідними є науково і економічно обґрунтований спосіб отримання пробіотичних похідних та достатня доказова база їх біологічної активності, лікувальної ефективності та безпеки. Нами були розроблені оригінальні способи одержання дериватів пробіотичних штамів *Bifidobacterium bifidum* 1 і *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 та в експериментах *in vitro* отримані дані, що демонструють високу інгібіторну щодо патобіонтів, стимуляторну щодо пробіотичних бактерій та імуномодуляторну активність дериват-вмісних безклітинних екстрактів (БКЕ) [12, 13, 14, 15]. Зважаючи на те, що активність *in vitro* не можна ототожнювати з активністю *in vivo*, перед нами постало завдання дослідити ефективність застосування БКЕ при інфекційному процесі та дисбіозі у лабораторних тварин.

Мета дослідження. Встановити здатність БКЕ з культур *B. bifidum* 1 та *L. reuteri* DSM 17938 з високою інгібіторною активністю щодо патобіонтів здійснювати протиінфекційний захист та корегувати мікроекологічні порушення *in vivo* при експериментальному моделюванні кишкової інфекції у мишей на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу.

Матеріали і методи. Дослідження з використанням лабораторних тварин були проведені на базі віварію ДУ «ІМІ НАМН» у відповідності до положень вітчизняних і міжнародних біоетичних документів: IV «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, ETS 123, 1986), законодавчих документів України з проведення експериментів на тваринах: «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (20.09.2001), методичні рекомендації [16] та були ухвалені Комітетом з біоетики Інституту. Тварини утримувалися у стандартних умовах віварію. В дослідженні були задіяні 44 миші обох статей, віком 2 місяці, вагою 22,0 ± 2,0 г, розподілені на 4 групи: 2 дослідні і 2 контрольні (позитивна і негативна), по 11 тварин у кожній. У тварин позитивної контрольної та дослідних груп було відтворено дисбактеріоз.

Для відтворення антибіотик-асоційованого дисбактеріозу кишечника у мишей в експерименті було обрано спосіб, описаний і запатентований Дармовим І. В. зі співавторами [17]. Спосіб моделювання дисбактеріозу передбачав щоденне пероральне одноразове введення тваринам впродовж 5 діб 0,1 мл розчину антибіотика з групи аміноглікозидів – гентаміцину у дозі, що перевищувала добову терапевтичну дозу аміноглікозидів для мишей при парентеральному введенні більш ніж у 4,8 рази і становила 2,9 мг (29 мг гентаміцину на 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду). Гентаміцин при пероральному введенні практично не всмоктується в шлунково-кишковому тракті і викликає мікроекологічні порушення в кишечнику. Згідно з літературними

даними, після попередньої індукції антибіотиками дисбіозу пероральне введення мишам будь-якого штаму *Staphylococcus aureus* у дозі 10^7 КУО викликає інфекційний процес з підгострим перебігом [18]. Дизайн нашого експерименту передбачав інфікування мишей двох дослідних та позитивної контрольної групи пероральним введенням 0,5 мл суспензії *S. aureus* ATCC 25923 (3×10^8 КУО/мл) через дві доби після закінчення введення антибіотика.

Миші двох дослідних груп щоденно отримували перорально БКЕ MBA та MLA у дозі 100 мкг. БКЕ MBA був отриманий з культури *B. bifidum* 1, а БКЕ MLA з культури *L. reuteri* DSM 17938, що культивувалися у власних дезінтегратах з додаванням аскорбінової кислоти (20 мг/мл) методом, описаним раніше [12].

У дослідних та позитивній контрольній групах тварин реєстрували клінічний перебіг захворювання. Критеріями оцінки перебігу інфекційного процесу були: зміни поведінки та втрата маси тіла тварин, зменшення об'єму спожитої їжі, ознаки дисфункції кишечника (діарея або пом'якшення фекалій). Неінфікованих та інфікованих мишей зважували перед інфікуванням та кожні 24 години впродовж 7 днів після інфікування. Розраховували показник маси тіла за формулою: М/Мп × 100 %, де М – маса тварин в день зважування, Мп – маса тварин в день інфікування.

Зміни складу кишкової мікрофлори у мишей, спричинених дисбіозом та інфекційним процесом, зокрема, за умови введення БКЕ, досліджували за допомогою бактеріологічного методу. Бактеріологічне дослідження фекалій здійснювали перед відтворенням антибіотик-асоційованого дисбактеріозу, через 2 доби після закінчення введення антибіотика, на 2-у, 3-ю, 5-у, 7-у добу перебігу змодельованого інфекційного процесу на тлі антибіотик-асоційованого дисбактеріозу. Визначали загальну кількість бактерій та кількість окремих представників кишкової мікрофлори: біфідо-, лактобактерій і стафілококів у фекаліях. Відібрані від кожної тварини фекалії зважували та суспендували у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду (1г : 10 мл). Готували ряд десятикратних розведень суспензії фекалій та здійснювали висів у поживні середовища: тіогліколеве середовище, середовище Манна-Рогоза-Шарпа (Biolife; Італія); біфідум-середовище («Фармактив», Україна) і жовтково-сольовий агар. Посіви інкубували впродовж 24-48 годин за температури 37°С, після чого проводили підрахунок колоній, що виросли. З урахуванням маси фекалій від кожної тварини та числа колоній, що виросли, розраховували кількість бактерій на 1 г фекалій (КУО/г).

Отримані показники в таблицях і на рисунках представлені як середнє значення зі стандартним відхиленням (x ± SD), n – відповідає кількості дослідних тварин. Результати аналізували за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим застосуванням t-критерію Стьюдента з корекцією Бонферроні. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущим.

Результати досліджень.

Отримані на 2-у добу після закінчення введення гентаміцину результати бактеріологічного дослідження фекалій свідчили про розвиток дисбактеріозу кишечника у мишей (табл. 1). В середньому на 4 порядки зменшилася загальна кількість бактерій (до ~ 10^5 КУО/г фекалій), кількість біфідобактерій (до ~ 10^2 КУО/г фекалій), лактобактерій (до ~ 10^4 КУО/г фекалій) та спостерігалася поява стафілококів (до ~ 10^2 КУО/г фекалій).

Таблиця 1. Кількість життєздатних бактерій у фекаліях здорових мишей та у мишей з дисбіозом на 2-у добу після закінчення введення антибіотика, (x ± SD), n=11

Кишкова мікрофлора	Групи тварин	
	здорові	з дисбіозом
Заг. кількість бактерій, КУО/г фекалій	$5,82 \pm 0,51 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,21 \times 10^{5*}$
Біфідобактерії, КУО/г фекалій	$6,19 \pm 0,54 \times 10^6$	$2,2 \pm 0,17 \times 10^{2*}$
Лактобактерії, КУО/г фекалій	$2,30 \pm 0,18 \times 10^8$	$1,62 \pm 0,09 \times 10^{4*}$
Стафілококи, КУО/г фекалій	–	$1,0 \pm 0,12 \times 10^2$

Примітка. * – відмінності статистично значущі порівняно з показниками у групі здорових тварин.

Як відомо, клінічні прояви дисбіозу можуть значно варіювати. В нашому експерименті ознаки дисфункції кишечка або зміни поведінки тварин не спостерігалися. Негативним наслідком дисбактеріозу є формування сприятливого підґрунтя для розвитку інфекційного процесу в

кишечнику. Наступним етапом експерименту було моделювання у мишей інфекційного процесу в кишечнику на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу. Після інфікування *S. aureus* у мишей групи позитивного контролю спостерігалося значне збільшення виділення стафілококів з фекаліями (рис. 1). На 2-у добу бактеріовиділення становило ~ 10^8 КУО/г фекалій. Інтенсивність виділення стафілококів з часом зменшувалася, досягаючи на 7-у добу ~ 10^3 КУО/г фекалій. За умови застосування БКЕ МВА та MLA показники бактеріовиділення були на 2-3 порядки нижчими порівняно з відповідними показниками у групі позитивного контролю протягом усього періоду спостереження. На відміну від групи позитивного контролю, в обох дослідних групах тварин на 7-у добу виділення стафілококів з фекаліями було відсутнім.

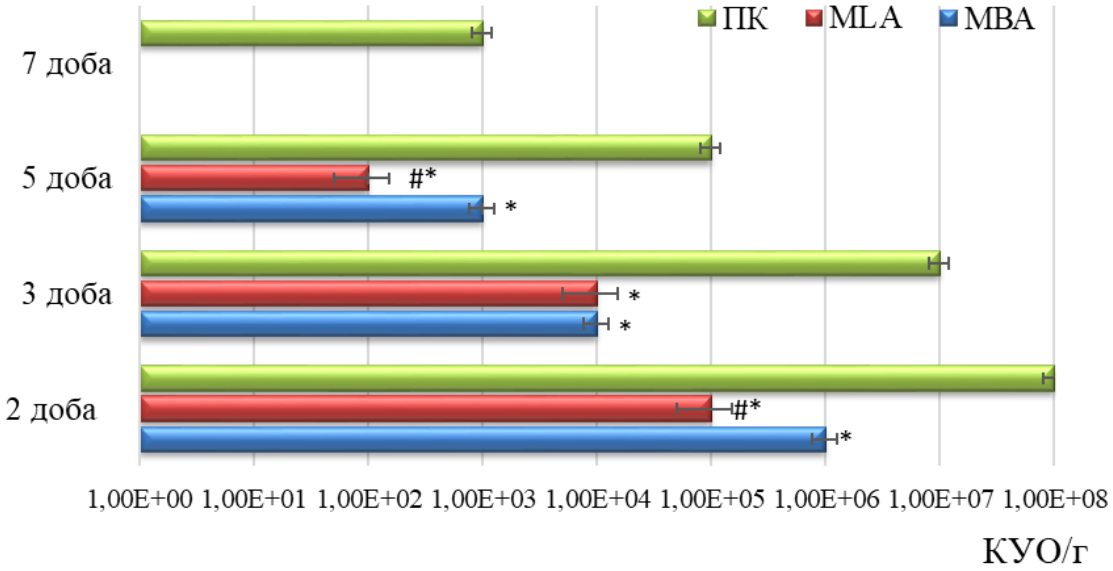

Рис. 1. Вплив БКЕ на динаміку виділення стафілококів з фекаліями у тварин, інфікованих культурою S. aureus на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу, (x ± SD), n=11.
*Примітка. ПК – група тварин позитивного контролю; МВА, MLA – дослідні групи тварин, яким вводили БКЕ; відмінності статистично значущі порівняно з: * – показниками у групі ПК; # – показниками у дослідній групі тварин, яким вводили БКЕ МВА.*

Загальна кількість бактерій у фекаліях мишей позитивної контрольної групи впродовж всього періоду від інфікування до 7-ї доби зменшувалася з ~ 10^8 КУО/г фекалій до ~ 10^5 КУО/г. Кількість біфідо- та лактобактерій у фекаліях мишей групи позитивного контролю впродовж всього періоду спостереження була стабільною і не перевищувала ~ 10^2 та ~ 10^4 КУО/г фекалій, відповідно.

Введення дослідних екстрактів інфікованим *S. aureus* мишам із антибіотик-асоційованим дисбіозом сприяло підвищенню загальної кількості бактерій: до ~ 10^7 КУО/г фекалій за умови застосування БКЕ МВА та до ~ 10^8 КУО/г фекалій за умови застосування БКЕ MLA. У разі введення БКЕ МВА кількість біфідобактерій зросла з ~ 10^2 до ~ 10^4 КУО/г фекалій, а кількість лактобактерій з ~ 10^4 до ~ 10^6 КУО/г фекалій. За умови застосування БКЕ MLA кількість біфідо- і лактобактерій до 7-ї доби збільшилася на 3 порядки, досягаючи кількості ~ 10^5 та ~ 10^7 КУО/г фекалій, але не досягаючи їх кількості у здорових тварин. Очевидно, для повного відновлення кількості біфідо- і лактобактерій у мишей необхідним було більш тривале введення БКЕ в експерименті. Але тенденція до відновлення нормального мікроекологічного балансу у кишковому біотопі дослідних тварин була достатньо вираженою.

При порівнянні ефективності застосування БКЕ з *B. bifidum* та і *L. reuteri* за кількісними показниками бактеріовиділення та відновлення вмісту позитивної мікрофлори виявлені очевидні переваги БКЕ MLA перед БКЕ МВА. За умови застосування БКЕ MLA спостерігалися: на порядок нижчий ступінь бактеріовиділення, вищий ступінь відновлення загальної кількості бактерій, зокрема, лакто- і біфідобактерій (табл. 2). Данний ефект можна пояснити більш високим інгібіторним потенціалом БКЕ MLA по відношенню до *S. aureus* та більш потужною здатністю стимулювати ріст пробіотичної мікрофлори.

Таблиця 2. Кількість життєздатних бактерій у фекаліях різних груп мишей на 7-у добу стафілококової інфекції на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу (x ± SD), n=11

Групи тварин	Кількість бактерій, КУО/г фекалій		
	загальна	біфідобактерій	лактобактерій
Інтактні (НК)	$4{,}77 \pm 0{,}38 \times 10^{9}$	$6{,}54 \pm 0{,}67 \times 10^{6}$	$3{,}40 \pm 0{,}2 \times 10^{8}$
Дисбіоз + інфекція (ПК)	$1{,}33 \pm 0{,}11 \times 10^{5\#}$	$2{,}9 \pm 0{,}22 \times 10^{2\#}$	$2{,}17 \pm 0{,}16 \times 10^{4\#}$
Дисбіоз + інфекція + БКЕ МВА	$3{,}9 \pm 0{,}17 \times 10^{7\#*}$	$3{,}4 \pm 0{,}25 \times 10^{4\#*}$	$5{,}71 \pm 0{,}43 \times 10^{6\#*}$
Дисбіоз + інфекція + БКЕ MLA	$6{,}8 \pm 0{,}38 \times 10^{8\#*}$	$2{,}2 \pm 0{,}17 \times 10^{5\#*}$	$4{,}62 \pm 0{,}09 \times 10^{7\#*}$

Примітка. Відмінності статистично значущі порівняно з: # – показниками у групі тварин НК, * – показниками у групі тварин ПК.

В ході дослідження у тварин позитивної контрольної групи спостерігалося статистично значуще зниження ваги з 1-ї по 5-у добу після інфікування, із нормалізацією даного показника тяжкості перебігу інфекційного процесу на 7-у добу спостереження (рис. 2). В 1-у та 2-гу добу у тварин цієї групи спостерігали рідкі випорожнення, на 5-у добу – пом'якшення фекалій. В 1-у добу після інфікування реєструвалося деяке зниження об'єму споживання їжі. Порівняно з групою позитивного контролю у тварин дослідних груп, які перорально отримували БКЕ МВА та MLA, спостерігалося достовірно менше зниження маси тіла в критичні перші дні інфекційного процесу, не спостерігалося змін поведінки та консистенції фекальних мас.

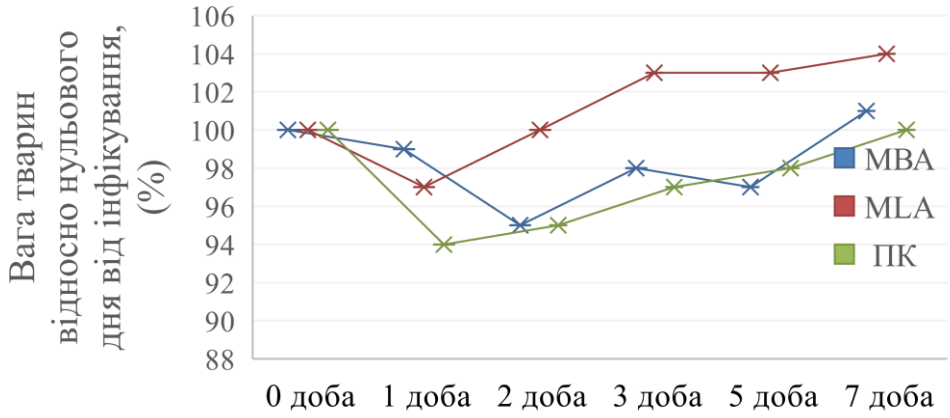

Рис. 2. Вплив БКЕ МВА та MLA на динаміку маси тіла мишей, інфікованих S. aureus на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу, (x ± SD), n=11.

Обговорення результатів. Таким чином, результати експериментального дослідження дозволяють стверджувати, що БКЕ з культур *B. bifidum* та *L. reuteri*, отриманих при культивуванні у власних дезінтегратах з додаванням аскорбінової кислоти, є перспективними засобами нормалізації складу кишкової мікрофлори. Про це свідчить виявлена здатність БКЕ прискорювати елімінацію збудника інфекційного процесу, сприяти відновленню кількісного вмісту представників позитивної мікрофлори кишечника та полегшувати перебіг інфекційного процесу. Одержані в даному дослідженні ефекти добре узгоджуються з отриманими нами раніше результатами вивчення бактеріотропних та імунотропних властивостей БКЕ і, очевидно, обумовлені здатністю БКЕ стимулювати проліферацію та біоплівкоутворення власної «корисної» індигенної мікрофлори, сприяти її приживленню у біоплівках, пригнічувати проліферацію умовно-патогенних бактерій та їх здатність до колонізації, а також справляти антиоксидантний вплив та чинити імуномолуляторну дію на клітини вродженого імунітету. Результати нашого дослідження підтверджують той факт, що для отримання пробіотичних ефектів не обов'язковим є збереження цілісності і життєздатності пробіотичних бактерій. Така

думка вже висловлювалася іншими авторами і була не безпідставною [19, 20]. Низка дослідників при застосуванні термічно інактивованих пробіотичних бактерій, супернатантів та бактеріальних екстрактів отримали пробіотичні ефекти на рівні кишечника [21, 22]. Очевидно, що ці ефекти були обумовлені біологічною активністю (імуномодуляторною, протизапальною та інгібіторною щодо патогенів) структурних компонентів та метаболітів, що вивільнялися зі зруйнованих клітин під час дезінтеграції або продукувалися бактеріями під час культивування.

Висновки. Безклітинні екстракти з культур *B. bifidum* 1 та *L. reuteri* DSM 17938, одержані з додаванням аскорбінової кислоти на етапі культивування, які в попередніх експериментах *in vitro* виявили високу інгібіторну активність щодо патобіонтів, в даному дослідженні продемонстрували здатність здійснювати протиінфекційний захист та корегувати мікроекологічні порушення *in vivo* при експериментальному моделюванні кишкової інфекції на тлі антибіотик-асоційованого дисбіозу у мишей. Корисні ефекти безклітинних екстрактів полягали в прискоренні елімінації збудника інфекції та збільшенні чисельності представників позитивної мікробіоти кишкового біотопу. Результати дослідження обґрунтовують необхідність проведення подальших клінічних випробувань для визначення ефективності безклітинних екстрактів при включенні їх у протоколи лікування дисбактеріозу.

Конфлікт інтересів відсутній.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дуда, О. К., Бойко, В. О., Коцюбайло, Л. П., & Голуб, А. П. (2017). Дисбиоз кишечника и его коррекция в практике врача-инфекциониста. Семейная медицина, 3 (71), 32-36. doi:10.30841/2307-5112.3(71).2017.115931
2. Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. Biochemical Journal, 474(11), 1823–1836. doi:10.1042/bcj20160510
3. Walker, W. A. (2017). Dysbiosis. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology, 227–232. doi:10.1016/b978-0-12-804024-9.00025-2
4. Becattini, S., Taur, Y., & Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. Trends in Molecular Medicine, 22(6), 458–478. doi:10.1016/j.molmed.2016.04.003
5. De Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? PLOS Medicine, 13(11), e1002184. doi:10.1371/journal.pmed.1002184
6. Iacob, S., & Iacob, D. G. (2019). Infectious threats, the intestinal barrier, and its Trojan Horse: dysbiosis. Frontiers in Microbiology, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01676
7. Wilkins, L. J., Monga, M., & Miller, A. W. (2019). Defining dysbiosis for a cluster of chronic diseases. Scientific Reports, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-49452-y
8. Shenderov, B. A. (2013). Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. Microbial Ecology in Health & Disease, 24(0). doi:10.3402/mehd.v24i0.20399
9. Singh, A., Vishwakarma, V., & Singhal, B. (2018). Metabiotics: the functional metabolic signatures of probiotics: current state-of-art and future research priorities—metabiotics: probiotics effector molecules. Advances in Bioscience and Biotechnology, 09(04), 147–189. doi:10.4236/abb.2018.94012
10. Richards, J. L., Yap, Y. A., McLeod, K. H., Mackay, C. R., & Mariño, E. (2016). Dietary metabolites and the gut microbiota: An alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. Clinical and Translational Immunology, 5(5), e82.
11. Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., Bonfiglio, G., Trancassini, M., Passariello, C., Pantanella, F, & Schippa, S. (2018). Rebuilding the gut microbiota ecosystem. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(8), 1679.
12. Knysh, O. V., & Martynov, A. V. (2020). Potentiation of the antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cell-free extracts by ascorbic acid. Medicni perspektivi, 25(1), 17-24. doi: 10.26641/2307-0404.2020.1.200393
13. Knysh, O. V., Pogorila, M. S., & Voyda, Y. V. (2020). In vitro immunomodulatory effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* cell free extracts. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 11(1), 93–97. doi:10.15421/022013
14. Knysh, O. V. (2019). Bifidogenic properties of cell-free extracts derived from probiotic strains of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri*. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 10(1), 124–128. doi:10.15421/021919
15. Knysh, O. V. (2019). The effects of cell-free extracts derived from probiotic strains *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* on the proliferation and biofilm formation by *Lactobacillus reuteri in vitro*. Zaporozhye Medical Journal, 0(6). doi:10.14739/2310-1210.2019.6.186711

16. Резніков, О. Г., Соловйов, А. І., Добреля, Н. В., & Стефанов, О. В. (2006). Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації. Вісник фармакології та фармації, (7), 47-61.
17. Дармов, И. В., Чичерин, И. Ю., Ердякова, А. С., Лундовских, И. А., & Погорельский, И. П. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных. Патент № 2477894. Российская Федерация, опубл. 20.03. 2013. Бюл, (8).
18. Larcombe, S., Jiang, J.-H., Hutton, M. L., Abud, H. E., Peleg, A. Y., & Lyras, D. (2020). A mouse model of *Staphylococcus aureus* small intestinal infection. Journal of Medical Microbiology, 69(2), 290–297. doi:10.1099/jmm.0.001163
19. Piqué, N., Berlanga, M., & Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: An overview. International Journal of Molecular Sciences, 20(10), 2534. doi:10.3390/ijms20102534
20. Lopetuso, L., Graziani, C., Guarino, A., Lamborghini, A., Masi, S., & Stanghellini, V. (2017). Gelatin tannate and tyndallized probiotics: a novel approach for treatment of diarrhea. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 21(4), 873-883.
21. Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). Genes & Nutrition, 6(3), 261–274. doi:10.1007/s12263-011-0218-x
22. Canducci F., Armuzzi A., Cremonini F., Cammarota G., Bartolozzi F., Pola P., Gasbarrini G., Gasbarrini A. (2000). A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 14(12), 1625–1629. doi:10.1046/j.1365-2036.2000.00885.x