

### Summary

EFFICIENCY OF CARBACETAM USE FOR RESTORATION OF COGNITIVE DISTURBANCES IN EXPERIMENTAL BRAIN INJURY  
Starodubska O. O.

Key words: traumatic brain injury, cognitive disturbances, Carbacetam

Numerous researches demonstrate development of cognitive disturbances at the traumatic brain injury (TBI) not only in the acute period, but also for several years after a trauma. Damage of the highest functions of a brain is observed at a third of patients from mild TBI, and at victims with a medium-weight and severe injury – more permanent and expressed disturbances develop. Carbacetam is a new GABA-benzodiazepine modulator of a receptor complex, derivative by  $\beta$ -Carboline which efficiency is intensively investigated at TBI.

The goal of given study was to investigate the efficiency of Carbacetam use for restoration of cognitive functions in experimental TBI. Methods. The research is conducted on white not purebred rats males; modeling of TBI carried out by V. N. Elsky & S. V. Ziablitsev (2005) technique. Included in control group 16 rats, experienced groups with TBI made 48 animals: the 1st group – with Carbacetam administration (5 mg/kg), the 2nd group – with Actovegin administration (16 mg/kg), group of comparison – with administration 1 ml of physical solution, intraperitoneal within 10 days after trauma. Cognitive disorders are investigated on techniques: the open field, a mink reflex, an eight-hose labyrinth in 7 and 30 days after trauma. Results and discussion. TBI results essential oppression of cognitive functions what indicators of tests of all experienced groups both through 7, and in 30 days after a trauma testified to. Renewal of indicators happened only under the influence of drugs: Carbacetam effectively renewed indicators of an approximate motor performance to reference level in 30 days after trauma. Also restoration of educational and research activity, emotionality, uneasiness and memory on indicators of tests with a mink reflex and an eight-hose labyrinth was observed. Efficiency of Carbacetam action in quantitative expression was more such an Actovegin. Conclusions. Results of Carbacetam efficiency investigation in experimental TBI showed restoration within 30 days of indicators of an approximate motor performance, educational and research activity and memory which doesn't concede efficiency of an Actovegin.

УДК 579.22:579.262:616.98-092.6/.7

**Степанський Д.О., Кременчуцький Г.М., Кошова І.П.**

### **ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АУТОШТАМІВ АЕРОКОКІВ З УМОВНО-ПАТОГЕННИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ IN VITRO**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

*Нормальна мікрофлора організму людини являє собою сукупність різних біоценозів, що займають численні екологічні ніші на шкірі і слизових оболонках всіх порожнин, сполучених із зовнішнім середовищем. Аеросoccus viridans володіють цілим рядом корисних властивостей. Була проведена серія експериментів з вивчення взаємодії аутоштамів аерококів на Gr + і Gr - бактерії. При вивченні відстроченого антагонізму показано, що тест-мікроорганізми по-різному реагують на присутність у середовищі вирощування продуктів метаболізму аутоштамів аерококів. Крім того, навіть усередині одного і того ж виду спостерігаються коливання. Аутоштами аерококів, на відміну від стафілококів та кишкової палички, не проявляють чутливості до дії активного початку псевдомонад. Аерококи володіють вираженими антагоністичними властивостями по відношенню до псевдомонад. Колонії псевдомонад, які виростають, як правило, не мають пігменту. Досліди показали, що аерококи є сильними антагоністами та отримані дані можуть служити підставою для подальшого вивчення застосування аутоштамів аерококів.*

Ключові слова: нормальна мікрофлора, аерококи, аутосимбіонти, антагонізм.

*Робота виконана в рамках докторської дисертації «Мікробіологічне обґрунтування аутоштамів роду Аеросoccus в якості основи для створення нових пробіотиків», № держ. реєстрації 0113U001948.*

#### **Вступ**

Розлад захисної функції мікрофлори під впливом різних чинників призводить до шлунково-кишкових захворювань інфекційної і аліментарної етіології, знижується здатність нормальної мікрофлори кишечника ефективно пригнічувати ріст патогенних мікроорганізмів.

Нормальна мікрофлора організму людини являє собою сукупність різних біоценозів, що займають численні екологічні ніші на шкірі і слизових оболонках всіх порожнин, сполучених із зовнішнім середовищем [6,8]. Біоплівка, як рукавич-

ка, покриває шкіру і слизові відкритих навколишньому середовищу порожнин здорової людини і тварин і складається крім мікроколоній мікроорганізмів з екзополісахаридів різного складу мікробного походження, а також муцину, що виділяється келихоподібними клітинами слизових. З функціональної точки зору, біоплівку можна порівняти з плацентою. Якщо остання регулює взаємовідносини плоду і організму матері, то біоплівка регулює взаємини між макроорганізмом і навколишнім середовищем.

Зменшення кількості нормальної кишкової мікрофлори веде до ослаблення конкуренції з па-

тогенами за рецептори слизової оболонки кишечника, знижується місцевий імунітет - продукція лізоциму, імуноглобуліну А [3].

Одним з напрямків сучасної профілактики і терапії дисбактеріозів стало використання в якості пробіотиків аутологічних штамів мікроорганізмів -представників протективної мікрофлори (аутопробіотиків). Розвитку даної концепції сприяли припущення про те, що пробіотичні мікроорганізми, які надходять в макроорганізм, здатні визивати дисбаланс аутомікрофлори господаря внаслідок антагонізму індигенних і промислових штамів [9,10].

Відповідно до думки Б.А. Шендерова [11], ще в період внутрішньоутробного розвитку організм дитини готується прийняти мікрофлору матері як «своєї», або, іншими словами, у нього формується імунологічна толерантність до нормальної мікрофлори.

Мікробна екологія кожної людини являє собою надзвичайно складну за складом систему. Отже, важко розробити і підібрати ефективний пробіотик для кожного індивідуума для підтримки його нормальної мікрофлори кишечника [1,2,15]. Крім того, пробіотичні мікроби бувають імунологічно не поєднані з конкретною людиною. Тому незабаром після завершення їх застосування швидко виводяться з організму [8,14]. Клінічні і експериментальні роботи по бактеріотерапії дисбіотичних порушень кишечника показали, що найкращий ефект досягається при індивідуальному підборі власних штамів, а також при використанні аутофлори [12,13]. Все це служить обґрунтуванням для подальшої концепції формування пробіотиків на основі аутоштамів.

Сформована ситуація вимагає пошуку нових засобів і підходів до лікування. Одним з найбільш обговорюваних в останні роки підходів до профілактики та лікування кишкових інфекцій є застосування аутопробіотиків [2,5,6].

Багатьма дослідниками встановлено важливу роль нормальної мікрофлори організму людини у підтримці його фізіологічного стану, забезпеченні гомеостазу і життєдіяльності. Особливу цікавість викликають представники нормальної мікрофлори людини - пробіотичні мікроорганізми [7].

Однак є невелика кількість фундаментальних досліджень, присвячених *Aerococcus*, *Acetovibrio*, *Butyrivibrio*, *Centipeda*, *Eutactarrium*, *Leptotrichia*, *Ruminobacteria*, *Solenomonas*, *Succinivibrio*. *Aerococcus viridans* володіють цілим рядом корисних властивостей, вироблених у процесі динамічної взаємодії як з макроорганізмом, так і з мікробіоасоціантами [2]. Наприклад, виявлена здатність аерококів окисляти молочну кислоту призводить до зниження рівня піпоксії в кишечнику; виділення пероксиду водню, який розщеплюється каталазою епітелію кишечника і також призводить до оксигенації тканин [4,7]. Глутатіонредуктазна активність, утворення кон'югатів глутатіону з ксенобіотиками та інші корисні властивості становлять інтерес для подаль-

шого вивчення їх впливу на гомеостаз макроорганізму [6].

### Мета дослідження

Розширене вивчення взаємин аерококів з Гр + і Гр - бактеріями, що мають значення у визначенні біоценотичних взаємин між патогенними бактеріями і нормальною мікрофлорою шкіри і слизових поверхонь організму людини.

### Матеріали та методи дослідження

У 1-й серії експериментів вивчені взаємини аерококів з Гр + і Гр – бактеріями. Для цього використовувалася метод відстроченого антагонізму [5]. Тест-культурою служив аутоштам *A. Viridans* Зч2015, виділений від людини.

На МПА засівалась штрихом звійс добової культури аутоштаму *A. viridans* в ізотонічному розчині натрію хлориду ( $2 \times 10^8$  мікробних клітин).

Для визначення оптичної щільності мікробної звійс використовувався прилад Densi-La-Meter. Оптична щільність за шкалою McFarland дорівнювала 0,7 ОД. Посів проводився по діаметру чашки Петрі.

Посіви інкубували 24 години при 37°C. Після інкубації до культури *A. viridans*, що виросла на чашці, перпендикулярно штрихом підсівали звійс свіжовиділених добових культур тест-штамів. У наших дослідженнях був розширений спектр умовно-патогенних і патогенних бактерій. Оптична щільність вимірювалась для кожної культури окремо і була ідентичною до щільності аутоштаму *A. viridans*.

Для статистичного аналізу використовували пакет прикладних програм Statistica v6.1. Кількісні ознаки представлені у вигляді середнього значення та його стандартної похибки ( $M \pm m$ ).

### Результати дослідження та їх обговорення

У табл.1 представлені результати проведеного дослідження.

Отримані дані (табл. 1) свідчать про те, що при вивченні відстроченого антагонізму тест-мікроби по різному реагують на присутність у середовищі вирощування продуктів метаболізму аутоштамів аерококів. Крім того, навіть в середині одного і того ж виду спостерігаються коливання. Відзначені значні зони затримки росту відносно стафілококів, псевдомонад, бактерій групи кишкової палички, баціл.

Одним з найбільш стійких мікроорганізмів до антагоністичної дії аерококів виявилася синьогнійна паличка. Псевдомонади є дуже пластичними бактеріями, самі можуть надавати антагоністичну дію на багато видів мікроорганізмів.

Для експерименту з вивчення дії аутосимбіотичних штамів аерококів на *P. aeruginosa* були відібрані 3 найбільш активні в біохімічному і антагоністичному відношенні ізоляти: 1) 5м2015 (виділений від мишей), 2) 3к2015 (виділений від щурів), 3) 3ч2015 (виділений від людини).

Таблиця 1  
Спектр антагоністичної активності аутоштаму *A. viridans* Зч2015

Види тест-культур	Кількість культур	Діаметр зон затримки росту (мм) тест-культур аерококами; M ± m
<i>S. aureus</i> ( № 209 ) Госпітальні штами	1 50	15,0 ± 1,0 12,0 ± 0,9
<i>P. vulgaris</i> (OX 19 221) Госпітальні штами	1 4	7,0 ± 1,0 5,1 ± 0,4
<i>P. mirabilis</i> ("H" № 2091)	1	6,0 ± 1,0
<i>P. aeruginosa</i> (№ 501) Госпітальні штами	1 26	5,5 ± 0,3 5,2 ± 0,2
<i>E. faecalis</i> (№ 6783) Госпітальні штами <i>E. coli</i>	1 8	4,0 ± 1,0 5,7 ± 0,8
<i>B. subtilis</i> (CCM 2216 ATCC 6051 )	1	4,0 ± 1,0

Вивчалась антагоністична активність псевдомонад, заздалегідь вирощених на МПА, щодо тест-культур: *S. aureus* 209; *E. coli* 675 і *A. viridans*. Аутоштами аерококів на відміну від стафілококів, кишкової палички - не проявляють чутливості до дії активного початку псевдомонад.

Наступна серія дослідів наочно демонструє

вплив аерококів на госпітальні штами *P. aeruginosa*, виділені від хворих Дніпропетровського обласного опікового центру, що охоплюють всі серогрупові і серотипові варіанти цього виду мікроорганізмів.

Поведінку псевдомонад у зоні антагоністичної дії аерококів в умовах відстроченого антагонізму представлено в табл. 2.

Таблиця 2  
Середні розміри зон (мм) затримки росту псевдомонад у зоні антагоністичної дії аерококів; M ± m; n = 5

Штами аерококів	Кількість клітин псевдомонад в 1 мл посівного матеріалу			
	1 · 10 <sup>9</sup>	1 · 10 <sup>8</sup>	1 · 10 <sup>7</sup>	1 · 10 <sup>6</sup>
5м2015	4,2± 0,1	11,3± 0,8	14,2± 0,1	16,3± 0,1
Зк2015	4,7± 0,2	12,3± 0,2	14,8± 0,2	16,2± 0,3
Зч2015	5,2± 0,2	14,2± 0,3	15,8± 0,2	18,6± 0,3

З табл. 2 видно, що культури псевдомонад проявляють чутливість до аерококів-антагоністів і продуктів їх метаболізму. При цьому зони пригнічення знаходяться в прямій залежності від кількості підсіяних мікробів.

Звертає увагу характер росту псевдомонад у зоні антагоністичної дії аутоштамів аерококів. По-перше, ріст псевдомонад менш інтенсивний і часто складається з окремих колоній. По-друге, він має суху поверхню і, що особливо цікаво, не має пігменту. Пігмент з'являється лише на 4-5-у добу зберігання культур при 20° С - 22° С. Крім того, при перегляді культур в світлі, яке має кут нахилу 43°, вони частіше блакитного, червоного або сірого, а не типового солом'яно-жовтого світіння, що спостерігається при переході *P. aeruginosa* з S в R - форми. Поява R- та перехідних від S- до R- форм серед залишених житте-

здатними псевдомонад у зоні антагоністичної дії аерококів свідчить про те, що вони потрапляють у несприятливі для життєдіяльності умови.

Аналогічні результати були отримані і в іншому варіанті експериментів. На м'ясопептонний агар в чашках Петрі засівали газонем 0,1 мл 1 млрд / мл суспензії *A. viridans* 167, а через добу інкубації при 37° агар перевертали дором дном і на його поверхню засівали також газонем різну кількість клітин псевдомонад: 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> мікробних тіл/мл. Після повторної добової інкубації при 37° С враховували наявність та інтенсивність росту псевдомонад. У табл. 3 наведені отримані результати, з яких видно, що аерококи володіють вираженими антагоністичними властивостями, колонії псевдомонад, які виростають, як правило, не мають пігменту.

Таблиця 3  
Інтенсивність росту *P. aeruginosa* (штамм № 463) на МПА, який містить продукти метаболізму аерококів; n = 10

Кількість підсіяних клітин псевдомонад	Інтенсивність росту псевдомонад
1 · 10 <sup>9</sup>	+++
1 · 10 <sup>8</sup>	315,1 ± 23,3 колоній
1 · 10 <sup>7</sup>	-

Позначення: +++ - більш 1000 колоній; - - відсутність росту.

### Висновки

При вивченні відстроченого антагонізму показано, що тест-мікроби по різному реагують на присутність у середовищі вирощування продуктів метаболізму аутоштамів аерококів. Крім того, навіть усередині одного і того ж виду спостерігаються коливання. Причому, чим більше вірулентний мікроорганізм, тим більше він стійкий до антагоністичної дії аерококів.

Аутоштами аерококів, на відміну від стафілококів та кишкової палички, не проявляють чутливості до дії активного початку псевдомонад.

Всі культури псевдомонад проявляють чутливість до аерококів-антагоністів і продуктів їх метаболізму.

Аерококи володіють вираженими антагоністичними властивостями по відношенню до псевдомонад. Колонії псевдомонад, які виростають, як правило, не мають пігменту.

Перспективи подальших досліджень. Досліди показали, що аерококи є сильними антагоністами та отримані дані можуть служити підставою для подальшого вивчення застосування аутоштамів аерококів.

### Література

1. Глушанова Н. А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* / Н.А. Глушанова, Б. А. Шендеров // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2003 - № 2. – С. 56–61.
2. Ильин В. К. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания / В.К. Ильин, А.И. Воложин, Г.В. Виха. – М. : Наука, 2005. – 271 с.
3. Соловьева Н.В. Коррекция дисбиотических нарушений при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени биологически активными добавками с пробиотическим действием / Н.В. Соловьева, С.Н. Лейхтер, Т.А. Бажукова [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2013. — Т. 8. — С. 48-57.
4. Кременчуцкий Г. Н. Роль микроэкологии организма человека и принципы ее коррекции / Г. Н. Кременчуцкий, С. А. Рыженко, С. И. Вальчук. – Днепрпетровск : Пороги, 2003. – 230 с.
5. Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ № 535 МЗ СССР от 22.04.1985. М., 1985. – 56 с.
6. Рыженко С.А. Вплив живої культури *Aerococcus viridans* на фактори імунологічної реактивності організму людини *in vitro* / С.А. Рыженко, С.І. Вальчук // Одес. мед. журнал. – 2003. - № 5 (79). – С. 108-111.
7. Рыженко С.А. Влияние А-бактерина на гомеостаз организма человека при различных патологических состояниях / С.А. Рыженко // Сб. материалов междунар. науч.-практ. конф. памяти Г.И. Гончаровой «Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования» / под ред. В.А. Алешкина. – Москва, 2002. – С. 41-42.
8. Michail S. Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children / S. Michail, F. Sylvestre, G. Fuchs, R. Issenman // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. – 2006. - Vol. 43, № 4. – P. 550–557.
9. Glushanova N.A. The relationship of probiotic lactobacilli and indigenous host in a co-culture *in vitro* / N.A. Glushanova, B.A. Shenderov // J. Epidemiol. Microbiol. Immunol.- 2003. - № 2. – P. 56–61.
10. Il'in V. K. Autoprotiotiki kak sredstvo profilaktiki infekcionno - vospalitel'nykh zabolovanij u cheloveka v iskusstvennoj srede obitaniya / V.K. Il'in, A.N. Suvorov, N.V. Kirjuhina // Vestnik RAMN. - № 2. – P. 56 - 62.
11. Shenderov B.A. Probiotic (symbiotic) bacteria languages / B.A. Shenderov // Anaerobe. – 2011. – Vol.17 (6). – P. 490-495.
12. Shumikhina I. Su1381 Autoprotiotic: Place in the Prevention of Postinfectious Irritable Bowel Syndrome / I. Shumikhina, Z. Sundukova, O. Solovyeva, V. Simanenkov // Gastroenterology. - 2015. – Vol. 148 (4). – P. S-492.
13. Simanenkov V. Tu1779 Personalized Therapy of Gastrointestinal Diseases With Symbiotic Bacteria / V. Simanenkov, A. Suvorov, Z. Sundukova // Gastroenterology. - 2014. – Vol. 146 (5). – P. S-841.
14. Steinhoff U. Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora / U. Steinhoff // Immunol. Letters. – 2005. – Vol. 99, Issue 1. – P. 12-16.
15. Kirjavainen P.V. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus FEMS / P.V. Kirjavainen, A.C. Ouwehand, I.E. Solauri [et al.] // Microbiol. Lett. - 1998. – Vol. 167, № 2. – P. 185–189.

### Реферат

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АУТОШТАМОВ АЭРОКОККОВ С УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ IN VITRO

Степанский Д.А., Кременчуцкий Г.Н., Кошечая И.П.

Ключевые слова: нормальная микрофлора, аерококки, аутосимбионты, антагонизм.

Нормальная микрофлора организма человека представляет собой совокупность различных биocenozов, занимающих многочисленные экологические ниши на коже и слизистых оболочках всех полостей, сообщающихся с внешней средой. *Aerococcus viridans* обладают целым рядом полезных свойств. Была проведена серия экспериментов по изучению взаимодействия аутоштамов аерококков на Gr + и Gr - бактерии. При изучении отсроченного антагонизма показано, что тест-микроорганизмы по-разному реагируют на присутствие в среде выращивания продуктов метаболизма аутоштамов аерококков. Кроме того, даже внутри одного и того же вида наблюдаются колебания. Аутоштамы аерококков в отличие от стафилококков и кишечной палочки не проявляют чувствительности к действию активного начала псевдомонад. Аерококки обладают выраженными антагонистическими свойствами по отношению к псевдомонадам. Колонии псевдомонад, которые вырастают, как правило, не имеют пигмента. Эксперименты показали, что аерококки являются сильными антагонистами и полученные данные могут служить основанием для дальнейшего изучения применения аутоштамов аерококков.

### Summary

INTERACTION BETWEEN AUTO STRAINS OF AERO COCCI AND OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN VITRO

Stepansky D. A., Kremenchutsky G. N., Koshevaya I. P.

Key words: normal micro flora, *Aerococci*, autosymbionts, antagonism.

Normal micro flora of the human body is a combination of various biocenoses that occupy numerous ecological niches in the skin and mucous membranes of cavities connected with the environment. *Aerococcus viridans* possess a number of useful properties. A series of experiments was carried out in order to study the interaction of auto strains on *Aerococcus* Gr+ and Gr- bacteria. While studying the deferred antagonism it was shown that the test organisms reacted on the presence of the growing metabolic products of autostrains *Aerococcus* in environment in different ways. Moreover, there were variations even within the same species. Autostrains *Aerococcus*, unlike *Staphylococci* and *E. coli*, showed no sensitivity to the action of the *Pseudomonas* active principle. *Aerococci* expressed antagonistic properties in relation to *Pseudomonas*. Growing *Pseudomonas* colonies usually have no pigment. Experiments have shown that *Aerococci* are strong antagonists and findings point out the need for further in-depth study of autostrains *Aerococcus* use.