

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵԼՍՍՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ ԳՈՀԱՐ ԳԱԳԻԿԻ

ՄԱՐԴԿԱՅԻՆ ԱԿՈՒՆՔԻՑ ՆՈՐ ԼԱԿՏՈԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ,  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՆՈՒՑՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2015

---

ИПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ГРИГОРЯН ГОАР ГАГИКОВНА

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ  
ЛАКТОБАКТЕРИЙ ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИСТОЧНИКА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.07 - «Микробиология»

ЕРЕВАН 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսաստեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Բ.Գ.դ., պրոֆեսոր Գ.Գ. Մելիք-Անդրեասյան  
կ.գ.թ. Ա.Խ. Չախալյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի Մ. Հերացու անվան  
պետական բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015թ. մարտի 24-ին, ժամը 15<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսաստեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաստեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսաստեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2015թ. փետրվարի 23-ին:

Մասնագիտական խորհրդի  
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

---

Тема диссертации утверждена в НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель: д.б.н., профессор Г.Г. Оганесян

Официальные оппоненты: д.м.н., профессор Г.Г. Мелик-Андреасян  
к.б.н. А.Х. Чахалян

Ведущая организация: Ереванский государственный медицинский  
университет имени М. Гераци

Защита диссертации состоится 24 марта 2015г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./ факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 23 февраля 2015г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

## ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

**Խնդրի արդիականությունը:** Կաթնաթթվային բակտերիաները լայնորեն տարածված են մարդու աղեստամոքսային և միզասեռական (ուռոզենիտալ) համակարգերում: Նրանք արտազատում են հակամանրէային միացություններ, ինչպիսիք են կաթնաթթուն, ջրածնի պերօքսիդը և բակտերիացինները [Hughes V.L., et al., 1990., Klebanoff S.J., et al., 1991]: Կաթնաթթվային բակտերիաները որպես պրոբիոտիկներ լայնորեն կիրառվում են ժամանակակից բժշկության մեջ դիսբակտերիոզների բուժման ժամանակ: Առողջությանը նպաստող ֆունկցիոնալ սննդի և դեղագործական պատրաստուկների պրոբիոտիկ բաղադրամասերի ընտրության չափորոշիչները հետևյալն են՝ ա) պետք է անջատված լինեն մարդու օրգանիզմից, բ) պետք է գոյատևեն աղեստամոքսային և հեշտոցային էկոհամակարգերում, գ) պետք է կայուն լինեն լեղու հանդեպ, դ) պետք է կարողանան ամրանալ հեշտոցային և աղիքային էպիթելիալ հյուսվածքներին:

Վերարտադրողական տարիքի կանանց մոտ կաթնաթթվային բակտերիաները հեշտոցային նորմալ միկրոֆլորայի մեծ մասն են կազմում՝ իրագործելով պաշտպանական ֆունկցիա սեռավարակների հանդեպ [Antonio M.A.D., et al., 1999, Cohen C.R., et al., 1995, Giorgi, A., et al., 1987]:

Հեշտոցի ինֆեկցիոն - բորբոքային հիվանդությունները վերարտադրողական տարիքի կանանց մոտ զբաղեցնում են առաջին տեղը և դրանց թիվը շարունակում է մեծանալ՝ չնայած այդ խնդրի հետազոտությունների առաջընթացին: Այդ հիվանդությունները կապված են վերարտադրողական համակարգի օրգանների հետ, ուստի կարող են բերել լուրջ դեմոգրաֆիկ հետևանքների: Համարվում է, որ կնոջ մոտ բակտերիալ վազինոզի հիմնական նախապայման է հանդիսանում հեշտոցային կաթնաթթվային բակտերիաների քանակի կտրուկ նվազումը կամ բացակայությունը հակաբիոտիկների, որոնք ախտածին բակտերիաների հետ մեկտեղ ոչնչացնում են նաև օգտակար կաթնաթթվային բակտերիաները, կամ սթրեսային գործոնների ազդեցության հետևանքով [Cohen C.R., et al., 1995, Hawes S.E., et al., 1996, Falagas M.E., et al., 2006]: Բակտերիալ վազինոզների բուժման առավել ռացիոնալ մոտեցում է համալիր բուժումը, որն ուղղված է ախտածին հարուցիչների ոչնչացմանը, իմուն համակարգի խթանմանը, հեշտոցի գաղութացմանը սկսելով պրոբիոտիկ լակտոբակտերիաներով [Hawes S.E., et al., 1996, Falagas M.E., et al., 2006]: Հեշտոցի գաղութացման համար առողջ կանանց հեշտոցային միկրոֆլորայից անջատված պրոբիոտիկ շտամները գերադասելի են, քան այլ աղբյուրներից, օրինակ յոգուրտներից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաները, որոնց ադապտացիայի արդյունավետությունը հեշտոցային բիոտոպում անհամեմատ ավելի ցածր է [Mitchell C., et al., 2012, Bastani P., et al., 2012, Mastromarino P., et al., 2013]: Բարձր հակաբակտերիալ և հակավիրուսային հատկություններով օժտված

պրոբիոտիկներով հեշտոցի վերագաղութացման թերապիան կարելի է կիրառել հասարակական առողջապահությունում ռիսկային խմբերի կանանց սեռական ճանապարհով փոխանցվող ինֆեկցիաներից, ներառյալ ՄԻԱՎ-ը, պաշտպանելու համար [Cribby S., et al., 2008, Gil N.F., et al., 2010, Ayenalem S., et al., 2010, Pashayan M.M., et al., 2011]: Այդ տեսանկյունից գերադասելի են լակտոբակտերիաների այն տեսակները, որոնք արտադրում են H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Pashayan M.M., et al., 2009, Balkus J.E., et al., 2012, Mitchell C., et al., 2012, Bastani P., et al., 2012, Mastromarino P., et al., 2013]: Նույն կամ տարբեր տեսակների պատկանող լակտոբակտերիաներից բաղկացած ոչ սիմբիոտիկ պրոբիոտիկ դեղաձևերի արդյունավետությունը բարձր չէ, քանի որ այդ լակտոբակտերիաներն ամբողջությամբ կամ մասնակիորեն անհետանում են ֆիզիոլոգիական ցիկլիկ պրոցեսների պատճառով:

Հեշտոցային նորմոֆլորան ձևավորվում է սպոնտան եղանակով սեռահասունացման շրջանում և նրանց տեսակային բազմազանությունը, կախված աշխարհագրական դիրքից, բնակլիմայական պայմաններից, կենսակերպից, խիստ տարբեր է [Collins J.K., et al., 1998]: Տարբեր երկրներում՝ ԱՄՆ, Կանադա, Շվեդիա, Բրազիլիա, Ճապոնիա, Չինաստան, Հնդկաստան, Էստոնիա, Իրան, ՀԱՀ, Կորեա, Բուլղարիա և այլն, լայնածավալ ուսումնասիրություններ են անցկացնում կանանց հեշտոցային կոմենսալ կաթնաթթվային բակտերիաների անջատման, նրանց տեսակային ու ենթատեսակային բազմազանության և բարձր ակտիվությամբ օժտված պրոբիոտիկների հայտնաբերման նպատակով: Հայաստանի կանանց հեշտոցային նորմոֆլորան դեռևս մնում է քիչ ուսումնասիրված, սակայն կան մեր կողմից ստացված նախնական տվյալներ, որ այն հարուստ աղբյուր կարող է հանդիսանալ նոր պրոբիոտիկների ստացման համար [Pashayan M.M., Hovhannisyann H.G., 2011]: Այս հանգամանքը հույժ կարևոր է դարձնում Հայաստանի առողջ կանանց հեշտոցային միկրոֆլորայից նոր, հակամանրէային բարձր ակտիվությամբ օժտված լակտոբակտերիաների անջատումը, ուսումնասիրությունը և նրանցից առավել բարձր ադապտիվ և պրոբիոտիկ հատկություններով օժտված լակտոբակտերիաների հիման վրա սիմբիոտիկ համակեցությունների ստեղծումը՝ դիսբակտերիոզների բուժման և կանխարգելման համար:

**Հետազոտության նպատակը:** Տվյալ աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել հայաստանաբնակ կանանց հեշտոցային միկրոֆլորայից անջատել նոր, բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված լակտոբակտերիաներ, ստեղծել բարձր ադապտիվ ու պրոբիոտիկ պոտենցիալով կայուն սիմբիոտիկ համակեցություններ՝ ուռոգենիտալ վարակների բուժման և կանխարգելման համար:

Խնդիրներն են՝

1. հայաստանաբնակ կանանց հեշտոցային միկրոֆլորայից կաթնաթթվային բակտերիաների անջատումը,
2. մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ և մետաբոլիկ հատկությունների ուսումնասիրության հիման վրա լակտոբակտերիաների դասակարգումն ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի և API 50 թեստի,
3. ընտրված լակտոբակտերիաների մոլեկուլյար-գենետիկական նույնականացումը,
4. ԿԹԲ-ների հակամանրէային ակտիվության և հակաբիոտիկների հանդեպ նրանց կայունության որոշումը,
5. անջատված կուլտուրաների ադիեզիվ ունակությունների *in vitro* ուսումնասիրությունը MATS թեստի միջոցով,
6. լակտոկոկերից և լակտոբացիլներից կազմված կայուն համակեցությունների ստեղծումը՝ նրանց միջև համատեղելիության, սիմբիոզի, համաազդեգացիայի և համատեղ աճի ուսումնասիրության հիման վրա,
7. ստեղծված սիմբիոտիկ համակեցությունների հակամանրէային ակտիվության ուսումնասիրությունը ԲՎ առաջացնող միկրոօրգանիզմների, հատկապես *Candida albicans* – ի հանդեպ:

**Գիտական նորույթը:** Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է հայաստանաբնակ վերարտադրողական տարիքի կանանց հեշտոցային միկրոֆլորան, որտեղից անջատվել են բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված կաթնաթթվային բակտերիաներ: Յույց է տրվել լակտոկոկերի առկայության բարձր հաճախականություն ( $\approx 30\%$ ) հայաստանաբնակ կանանց մոտ: Կատարվել է 40 լակտոբակտերիաների մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կուլտուրալ, մետաբոլիկ հատկությունների ուսումնասիրություն և դասակարգում ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի, API 50 թեստի և մոլեկուլյար-գենետիկական տվյալների: Որոշվել է կուլտուրաների հակամանրէային ակտիվությունը, ադիեզիվ ունակությունները: Առաջին անգամ լակտոկոկերն ուսումնասիրվել են լակտոբացիլների հետ հեշտոցի համատեղ գաղութացման նպատակով: Առավել բարձր աճի արագությամբ և հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված լակտոկոկերից և լակտոբացիլներից ստեղծվել են սիմբիոտիկ կայուն համակեցություններ: Առաջին անգամ ցույց է տրվել հեշտոցային լակտոկոկերի և լակտոբացիլների միջև սիներգիզմի առկայությունը, որն արտահայտվում է նրանց համատեղ բարձր աճի արագության և հակամանրէային ակտիվության դրսևորմամբ:

**Գործնական նշանակությունը:** Անջատված բակտերիալ շտամները և նրանցով կազմված համակեցությունները կարելի է օգտագործել ինչպես մոմիկային ու պատիճային դեղաձևերի, այնպես էլ պրոբիոտիկ կաթնամթերքների արտադրության մեջ՝ հեշտոցային դիսբակտերիոզների, սեռավարակների կանխարգելման և բուժման, ինչպես նաև հակաբակտերիալ թերապիայից հետո հեշտոցի վերագաղութացման համար:

**Կապը գիտական թեմաների հետ:** Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ Կրթության և գիտության նախարարության Գիտության պետական կոմիտեի բազային ֆինանսավորման միջոցներով:

**Հեղինակի անձնական ներդրումը:** Հեղինակի անձնական ներդրումը ներառում է նմուշառումը, մորֆո-ֆիզիոլոգիական, կոլտուրալ, մետաբոլիկ հատկությունների ուսումնասիրությունը, ԿԹԲ-ների դասակարգումը ըստ Բերջիի բակտերիաների որոշիչի, API 50 թեստի և մոլեկուլյար-գենետիկական տվյալների, բարձր աճի արագությամբ և հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված սիմբիոտիկ կայուն համակեցությունների ստեղծումը և ուսումնասիրությունը, գիտական հոդվածների և ատենախոսության ձևակերպումը: Հիմնական խնդիրների ձևակերպումը և նոր մեթոդների ներդրումն ու մշակումը, ինչպես նաև հետազոտությունների արդյունքները քննարկվել և ամփոփվել են գիտական ղեկավար կ.գ.դ. պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյանի հետ համատեղ:

**Աշխատանքի քննարկումը:** Ատենախոսության արդյունքները զեկուցվել են՝ Human Microbiome Research Conference, August 31-September 2, 2010, USA, St. Louis, Missouri, Modern State of Biotechnological Developments and Ways of Commercialization Conference”, September 11-12, 2012, Yerevan, Armenia, Contribution of the Young Generation in the Development of Biotechnology, 2-nd International Scientific Conference of Young Researchers, October 1-4, 2013, Yerevan, Armenia, International Scientific Workshop “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, October 5-8, 2014, Yerevan, Armenia միջազգային գիտաժողովներում և «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գիտական խորհրդի նիստերում:

**Տպագրված աշխատանքները:** Ատենախոսության արդյունքները հրատարակված են 3 միջազգային և հանրապետական գիտական ամսագրերում հոդվածների ձևով, 4 միջազգային գիտաժողովների թեզիսների ժողովածուներում և 2 ՀՀ արտոնագրերում:

**Աշխատանքի իրականացման վայրը:** Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Կաթնաթթվային բակտերիաների և շաքարասնկերի լաբորատորիայում:

**Աշխատանքի ծավալը և կառուցվածքը:** Աշխատանքը կազմված է ներածությունից, գրական ակնարկից, հետազոտությունների նյութերից և մեթոդներից, հետազոտությունների արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացությունից և գրականության ցանկից: Աշխատանքը շարադրված է 105 էջի վրա, ներառում է 26 աղյուսակ, 18 նկար և 196 գրական հղում:

## ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գրական ակնարկը նվիրված է մարդու օրգանիզմի տարբեր բիոտոպների միկրոֆլորայի նկարագրությանը: Կախված տարբեր երկրների աշխարհագրական դիրքից, բնակլիմայական պայմաններից և սոցիալական վիճակից ուռոգենիտալ միկրոֆլորայի կազմի և բազմազանության վերլուծությանը: Ժամանակակից բժշկական պրակտիկայում ԲՎ-ի բուժման և կանխարգելման կենսաբանական միջոցների կիրառմանը:

## ԳԼՈՒԽ 2. ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈՂՆԵՐ

Ստենախոսության այս գլխում ներկայացված են մանրէային կուլտուրաները, նրանց պահպանման եղանակները, սննդամիջավայրերը և մեթոդները: Մանրամասն նկարագրված են նմուշառումը հեշտոցից, կուտակային կուլտուրաների ստացումը, կուլտուրաների աճի արագության, արգինինից ամփակի առաջացման, լեղու, NaCl-ի, 0.1% մեթիլեն կապույտի նկատմամբ կայունության, կատալազային, հակամանրէային ակտիվությունների և նրանց վրա պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների ազդեցության, ջրածնի պերօքսիդի քանակի, հակաբիոտիկների հանդեպ զգայունության, պոտենցոմետրիկ և տիտրացվող թթվայնությունների որոշման մեթոդները:

Համակեցությունների կայունությունը որոշվել է pH 7.3 - 7.6 LAPTg արգանակի մեջ պարբերական վերացանքների միջոցով: Բացիլների և կոկերի քանակները որոշվել են M16 ազարի վրա ցանքսի միջոցով՝ հաշվելով մեծ և փոքր գաղութները:

Մանրէների ինքնաազրեգացիան որոշվել է հայտնի մեթոդով որոշակի փոփոխությամբ [Del Re, et al., 2000] հետևյալ բանաձևով.

$$\left(1 - \frac{At}{Ao}\right) \times 100,$$

որտեղ  $A_t$ -ն ՕԽ-ն է, երբ  $t = 1, 2, 3, 4$  և  $5$  ժամ, իսկ  $A_o$ -ն՝  $t = 0$ :

Իսկ համաազրեգացիան որոշվել է հետևյալ բանաձևով [Handley et al., 1987].

$$\text{Համաազրեգացիա (\%)} = \frac{\frac{(Ax + Ay)}{2} - A(x + y)}{\frac{Ax + Ay}{2}} \times 100,$$

որտեղ  $x$  և  $y$ -ը առանձին կուլտուրաների ՕԽ-ներն են, իսկ  $(x+y)$ ՝ նրանց խառնուրդինը:

Մանրէների ադիեզիայի ունակությունը որոշվել է *in vitro* MATS թեստի միջոցով [Crow, Gopal, 1995]: Ադիեզիայի տոկոսը հաշվարկվել է հետևյալ կերպ.

$$\left(1 - \frac{A}{Ao}\right) \times 100,$$

որտեղ  $A_o$ -ն ՕԽ-ն է բջջային կախույթին լուծիչ ավելացնելուց անմիջապես հետո, իսկ  $A$ -ն՝ ՕԽ-ն ջրային շերտը հեռացնելուց հետո:

Կուլտուրաների սիմբիոտիկ ինդեքսները (SI) որոշվել են

$$SI = \text{ՕԽ}_{\text{խառը}} / \text{ՕԽ}_{\text{ան.}} \text{ բանաձևով,}$$

որտեղ  $O_{\text{խառը}}$  խառը կուլտուրայի առավելագույն  $O_{\text{խ}}$ -ն է, իսկ  $O_{\text{խառ}}$ ՝ առանձին կուլտուրաների առավելագույն  $O_{\text{խ}}$ -ներն են [Хархота М.А., Осадчая А.И., 2011]:

Լակտոբակտերիաների կենսահամատեղելիությունը որոշվել է ազարի վրա օդասեղով խառը կուլտուրայի և առանձին կուլտուրաների համադրվող կաթիլներով ցանքսերի եղանակներով:

Սանրէների կողմից ածխաջրային նյութափոխանակությունն ուսումնասիրվել է API 50 բիոքիմիական թեստերի ստանդարտ համակարգի միջոցով: Լակտոբակտերիաների մոլեկուլյար-գենետիկական նույնականացումն իրագործվել է RAPD ՊՇՌ մեթոդով:

### **Տվյալների վիճակագրական մշակումը**

Փորձերը տարվել են 3 - 5 կրկնությամբ, ստացված տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման ըստ Ստյուդենտի թեստի (տվյալների հավաստիության գնահատման համար օգտագործվել է R Project for Statistical Computing version R 3.1.1. ծրագիրը): Աշխատանքում ներկայացված տվյալները համարվում են հավաստի ( $p < 0.05$ ), եթե այլ արժեքներ հետազայում դիտարկված չեն: Գրաֆիկների կառուցումը կատարվել է Microsoft Office Excel 2013 համակարգչային ծրագրով:

## **ԳԼՈՒԽ 3. ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԱՆՋԱՏՈՒՄԸ ԵՎ ՆՈՒՑՆԱԿԱՆԱՑՈՒՄԸ**

### **3.1. Լակտոբակտերիաների անջատումը և մաքուր կուլտուրաների ստացումը**

Վերարտադրողական տարիքի 39 կանանցից վերցվել են հեշտոցային քսուքներ և տեղափոխվել ստերիլ յուղազերծ կաթի մեջ՝ կուտակային կուլտուրաներ ստանալու համար: Հեշտոցի միկրոֆլորայի բազմազանության որոշման համար նմուշը զիզգագաձև ցանվել է LAPTg ազարի վրա: Կաթի մակարդուկներից LAPTg ազարի վրա կատարված ցանքսի միջոցով ստացվել են ԿԹԲ-ների 40 մաքուր կուլտուրաներ՝ 25 բացիլներ (62.5%) և 15 կոկեր (37.5%):

### **3.2. Լակտոբացիլների հատկությունների ուսումնասիրությունը**

Անջատված բոլոր բացիլները տարբերվում են իրենց գաղութների և բջիջների չափսերով, Գրամ դրական են, օժտված չեն կատալազային և օքսիդազային ակտիվություններով, ընդունակ են մոնոկուլտուրաներով ֆերմենտացնելու կաթը և բացառությամբ մեկի առաջացում են ամիակ արգինինից:

Տարբեր պայմաններում աճի ուսումնասիրության արդյունքում պարզվեց, որ լակտոբացիլներից  $10^{\circ}\text{C}$ -ում աճում են միայն հինգը, մյուսները՝  $>20^{\circ}\text{C}$ , իսկ  $50^{\circ}\text{C}$ - ում աճում են բոլորը: Լակտոբացիլների մեծամասնությունը կայուն են 0.1% մեթիլեն կապույտի, 20% լեղու, 6.5% NaCl-ի և pH 9.2-ի նկատմամբ:

Անջատված շտամների զգալի մասն օժտված է հակամանրէային բարձր ակտիվությամբ *S. aureus*, *E. coli* և *C. albicans* թեստ շտամների նկատմամբ:



Ըստ Բերքիի որոշիչի ցուպիկները նույնականացման արդյունքում նրանք բաժանվել են *L. plantarum* (9), *L. acidophilus* (5), *L. delbrueckii* (6), *L. helveticus* (2), *L. fermentum* (1), *L. salivarius* (1), *L. rhamnosus* (1) տեսակների:

**3.3. Լակտոկոկերի հատկությունների ուսումնասիրությունը**

Բոլոր կոկերը Գրամ դրական են, կատալազա և օքսիդազա բացասական, արգինինից ամիակ առաջացնում են բոլորը, բացի վեցից: Նրանց ճնշող մեծամասնությունն օժված է արտահայտված հակամանրէային ակտիվությամբ:

Շտամների մեծամասնությունը կայուն է 4.0% NaCl-ի, և 20% լեղու հանդեպ: pH 9.2 միջավայրում և 0.1% մեթիլեն կապույտով կաթում աճում են 9 կուլտուրաներ:

Անջատված լակտոկոկերն աճում են 15 - 45°C -ում, իսկ 50°C-ում՝ հինգը:

Վերոնշյալ հատկությունների և ածխաջրերի յուրացման պրոֆիլի հիման վրա լակտոկոկերն, ըստ Բերքիի որոշիչի, բաշխվել են *L. lactis* (9), *L. cremoris* (5), *Str. thermophilus* (1) տեսակների մեջ:

**3.4. ԿԹԲ-ների հակամանրէային ակտիվությունը պայմանավորող նյութի բնույթի ուսումնասիրությունը**

Ուսումնասիրվել է բարձր հակամանրէային ակտիվությամբ օժտված շտամների վերնստվածքային հեղուկների զգայունությունը պրոտեոլիտիկ ֆերմենտների նկատմամբ՝ պրոտեինազ K, պեպսին և տրիպսին (Աղ. 1):

Աղյուսակ 1.

Պրոտեազների ազդեցությունը վերնստվածքային հեղուկների հակամանրէային ակտիվության վրա

ԿԹԲ շտամ	Վերնստվածքային հեղուկով թեստ-շտամների աճի ճնշման գոտիները պրոտեազներով մշակումից առաջ և հետո, մմ					
	<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>	
	Առաջ	Հետո	Առաջ	Հետո	Առաջ	Հետո
GH4	15 ± 0.3	8 ± 0.3	14 ± 0.3	8 ± 0.3	12 ± 0.3	8 ± 0.3
GH6	14 ± 0.4	8 ± 0.4	13 ± 0.4	≤6	11 ± 0.4	≤6
GH8	26 ± 0.3	18 ± 0.3	25 ± 0.3	20 ± 0.3	20 ± 0.3	17 ± 0.3
GH20	15 ± 0.2	≤6	14 ± 0.2	≤6	12 ± 0.2	≤6
GH24	20 ± 0.3	≤6	14 ± 0.3	≤6	12 ± 0.3	≤6
GH31	25 ± 0.3	15 ± 0.3	26 ± 0.3	15 ± 0.3	12 ± 0.4	12 ± 0.3
GH32	15 ± 0.4	≤6	15 ± 0.4	≤6	15 ± 0.4	≤6
GH38	14 ± 0.3	≤6	13 ± 0.3	≤6	12 ± 0.3	≤6
GH39	20 ± 0.4	≤6	21 ± 0.4	12 ± 0.4	18 ± 0.3	10 ± 0.4
GH40	16 ± 0.3	≤6	15 ± 0.3	≤6	13 ± 0.3	≤6

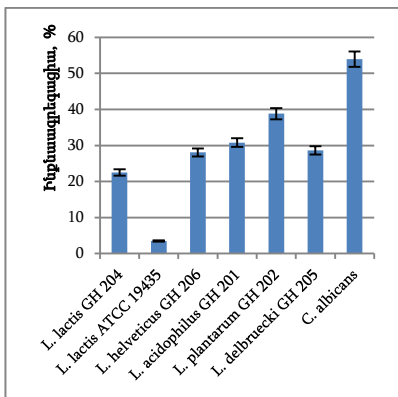
Պրոտեազներով մշակելուց հետո կուլտուրաների մեծ մասի մոտ հակամանրէային ակտիվությունն ամբողջությամբ կամ մասնակիորեն վերանում է, բացառությամբ GH8, GH31, GH39 շտամների: Վերջինների մոտ հակամանրէային ակտիվությունը պայմանավորված է ոչ սպիտակուցային միացություններով, ինչպես օրինակ  $H_2O_2$ -ով: Փորձը ցույց տվեց, որ աերոբ պայմաններում GH8 շտամի վերնստվածքային հեղուկում  $H_2O_2$  արտադրությունը կազմում է 100 մգ/լ, իսկ GH31, GH39 շտամների մոտ առկա է ավելի փոքր քանակություն՝ 10-30 մգ/լ: Անաերոբ պայմաններում այդ ակտիվությունները համապատասխանաբար կազմել են 30-50 մգ/լ և 3-10 մգ/լ:

### 3.5. ԿԹԲ-ների կայունության ուսումնասիրությունը հակաբիոտիկների հանդեպ

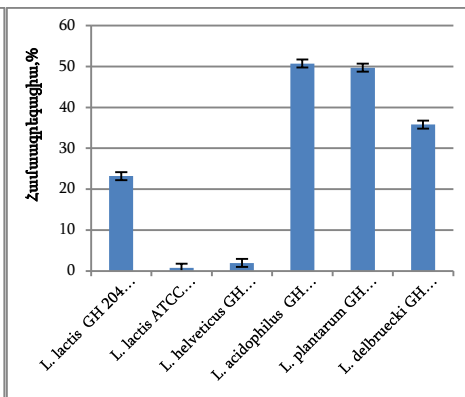
Քանի որ տարբեր վարակիչ հիվանդությունների ժամանակ օգտագործվող հակաբիոտիկները ազդում են նաև ԿԹԲ-ների վրա, ուստի ստուգվել է նրանց կայունությունը առավել հաճախ օգտագործվող հակաբիոտիկների հանդեպ: Ստանդարտ սկավառակների միջոցով հայտնաբերվեց, որ անջատված կուլտուրաները կայուն են ցիպրոֆլոքսացինի, վանկոմիցինի, ստրեպտոմիցինի, կլինդամիցինի և մետրոնիդազոլի հանդեպ:

### 3.6. ԿԹԲ-ների ինքնաազրեզացիայի և համաազրեզացիայի ուսումնասիրությունը

*In vitro* ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ մեր կողմից անջատված ԿԹԲ-ներից ինքնաազրեզացիայի բարձր ունակությամբ օժտված են *L. plantarum* GH 202, *L. acidophilus* GH 201, *L. helveticus* GH 206 և *L. delbruecki* GH 205, *L. lactis* GH 204 –ը, ինչպես նաև վազինոզների հիմնական պատճառ հանդիսացող *C. albicans* – ը (Նկ. 1 ա):



ա)



բ)

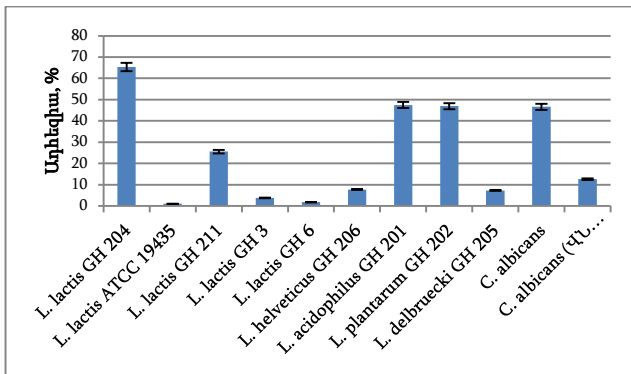
Նկար 1. Մանրէների ինքնաազրեզացիան (ա) և համաազրեզացիան *C. albicans*-ի հետ (բ)

Անջատված *L. acidophilus* GH 201, *L. plantarum* GH 202 և *L. delbruecki* GH 205, *L. lactis* GH 204 շտամներն օժտված են *C. albicans*-ի հետ բարձր համաագրեգացիոն ընդունակությամբ, համապատասխանաբար՝ 50.73%, 49.71% և 35.8%, 23.18%: Այն դեպքում, երբ հայտնի *L. lactis* ATCC 19435 շտամի համաագրեգացիան ընդամենը 0.76% է (Նկ. 1 բ):

Պրոբիոտիկ շտամների ինքնագրեգացիան կարևոր չափորոշիչ է հանդիսանում էպիթելիալ բջիջներին ադիեզիայի արդյունավետությունը գնահատելու համար, իսկ համաագրեգացիան՝ ախտածին միկրոօրգանիզմների ադիեզիայի խոչընդոտման համար [Del Re, et al., 2000, Kotzamanidis, et al., 2010]:

### 3.7. ԿԹԲ-ների ադիեզիվ ունակությունների որոշումը

Բակտերիալ ադիեզիան *in vivo* ուսումնասիրելը, հատկապես մարդկանց մոտ, բավականին դժվար խնդիր է, ուստի մշակվել են համարժեք *in vitro* մոդելներ՝ շտամների ադիեզիվ պոտենցիալը պարզելու համար [Mayra-Makinen A., 1983, Kimoto H., Kurisaki J., 1999]: Էպիթելիալ բջիջների վրա բակտերիաների ադիեզիան նախապայման է հանդիսանում կենսաթաղանթի ձևավորման համար [Marteau P., Rambaud J.C., 1993]: Այն պայմանավորված է նրանց մակերեսի հիդրոֆորությամբ, որը գնահատվել է մանրէային ադիեզիան լուծիչների վրա թեստի (MATS) միջոցով, որտեղ որպես լուծիչ օգտագործվել է քսիլոլը (Նկ. 2):



\* *L. plantarum* GH 202-ի վերնասովածրային հեղուկով մշակված *C. albicans*-ի բջիջները  
Նկար 2. Մանրէների ադիեզիան քսիլոլի վրա

Ինչպես երևում է նկ. 2-ից *L. lactis* GH 204-ը և *L. lactis* GH 211-ը օժտված են, դեռևս կոկերի համար չնկարագրված, բարձր հիդրոֆորությամբ՝ համապատասխանաբար 65.32% և 25.52%: Մյուս լակտոկոկերը հիդրոֆորությամբ չեն տարբերվում հայտնի *L. lactis* ATCC 19435 և *L. lactis* HV219 շտամներից և ցուցաբերում են ընդամենը 0.78 – 4.0% հիդրոֆորություն

[Elliott J.A., et al., 1996, Todorov S.D., et al., 2007]: Լակտոբացիլներից առավել բարձր հիդրոֆոբությամբ օժտված են *L. acidophilus* GH 201 և *L. plantarum* GH 202 շտամները, որոնք ունեն համապատասխանաբար՝ 47.47% և 46.94% հիդրոֆոբություն, ինչը վկայում է նրանց բարձր ադիեզիվ ընդունակության մասին: Բարձր ադիեզիվ հատկություն ի հայտ բերվեց նաև *C. albicans*-ի մոտ (46.6 %), որը սակայն կտրուկ նվազում է *L. plantarum* GH 202 վերնստվածքային հեղուկով մշակելու արդյունքում՝ հասնելով 12.64 % - ի:

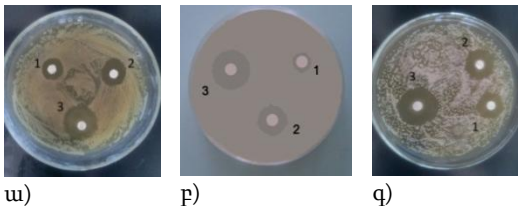
#### ԳԼՈՒԽ 4. ԼԱԿՏՈՒԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԲՆԱԿԱՆ ԵՎ ԱՐՇԵՍԱԿԱՆ ՄԻՄԲԻՈՏԻԿ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

##### 4.1. Բնական համակեցությունների անջատումը և ուսումնասիրությունը

Հեշտոցային բիոտոպի պրոբիոտիկային կուլտուրաների ինքնաբերաբար ձևավորվող բնական համակեցությունները, որոնց կայունությունը մինչ այժմ լիարժեք ուսումնասիրված չէ: Այս աշխատանքի ընթացքում մեզ հաջողվեց հայտնաբերել լակտոբացիլից և լակտոկոկից կազմված համակեցություն, որը պահպանվում էր *in vitro* բազմակի վերացանքսերի պայմաններում: Համաձայն Բերջիի որոշիչով նույնականացման այդ համակեցությունը կազմող բակտերիաները պատկանում էին *L. acidophilus* և *L. lactis* տեսակներին, որոնք համապատասխանաբար անվանվել են *L. acidophilus* GH 210 և *L. lactis* GH 211:

MRS միջավայրում այդ կուլտուրաների աճի ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ խառը կուլտուրայի կենսազանգվածը զգալիորեն զերազանցում է մոնոկուլտուրաների կենսազանգվածները, որը վկայում է նրանց միջև սիմբիոզի առկայության մասին: Նշված շտամների հակամանրէային ակտիվության որոշումը ի հայտ բերեց սիներգիզմի ցայտուն արտահայտություն (Նկ. 3):

Այսպես, խառը կուլտուրայի վերնստվածքային հեղուկը բոլոր թեստ-շտամների վրա առաջացնում է 22-25 մմ տրամագծով ճնշման գոտիներ, այն դեպքում, երբ մոնոկուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկներն առաջացնում են զգալիորեն փոքր աճի ճնշման գոտիներ, համապատասխանաբար՝ 10-12 մմ և 12-16 մմ:

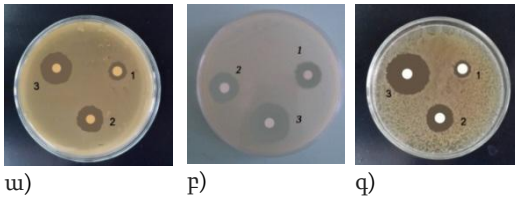


Նկար 3. Թեստ-շտամների՝ ա) *E. coli* MDC 5003, բ) *S. aureus* MDC 5233, գ) *C. albicans* MDC 8013, ճնշման գոտիները կուլտուրաների վերնստվածքային հեղուկներով (1 – *L. lactis* GH 211, 2 – *L. acidophilus* GH 210, 3 – խառը կուլտուրա)

#### 4.2. Լակտոբացիլներից և լակտոկոկերից կազմված բարձր պրոբիոտիկ և ադապտիվ հատկություններով օժտված կայուն համակեցությունների ստեղծումը և ուսումնասիրությունը

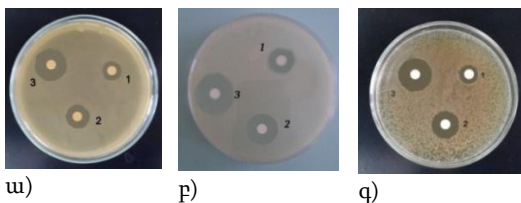
Հաշվի առնելով բնական համակեցության ավելի բարձր հակամանրէային ակտիվությունը նրա կազմի մեջ մտնող առանձին կուլտուրաների հանդեպ՝ որոշվեց հեշտոցի գաղութացման / վերագաղութացման արդյունավետության բարձրացման համար կոկերի և ցուպիլկների համադրմամբ ստեղծել սիմբիոտիկ համակեցություններ:

Կուլտուրաների կենսահամատեղելիությունը համատեղ աճի և համադրվող կաթիլներով ազարի վրա ցանքսի եղանակներով որոշելուց հետո *L. lactis* GH 204, *L. acidophilus* GH 201 և *L. plantarum* GH 202 –ը ընտրվել են համակեցություններ ստեղծելու համար: Առանձին կուլտուրաների և նրանցով կազմված համակեցությունների գիշերային կուլտուրաների վերստվածքային հեղուկների հակամանրէային ակտիվությունները որոշվել են թեստ-շտամների վրա սկավառակային դիֆուզիոն մեթոդով (Նկ. 4 և 5):



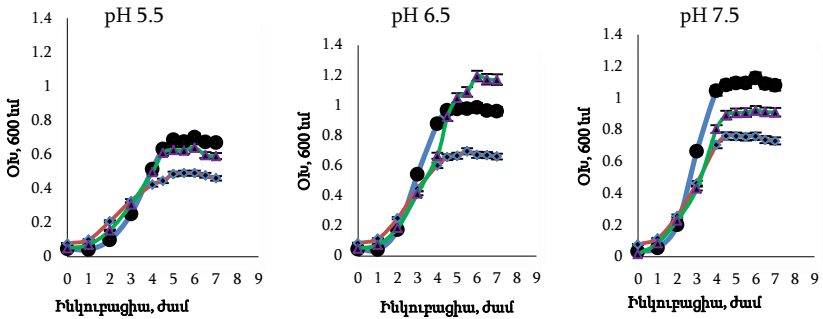
Նկար 4. Թեստ-շտամների՝ ա) *E. coli* MDC 5003, բ) *S. aureus* MDC 5233, գ) *C. albicans* MDC 8013, ճնշման գոտիները կուլտուրաների վերստվածքային հեղուկներով (1 – *L. lactis* GH 204, 2 – *L. plantarum* GH 202, 3 – խառը կուլտուրա)

Ինչպես երևում է Նկ. 4 և 5-ից *L. lactis* GH 204 ու *L. plantarum* GH 202 և *L. lactis* GH 204 ու *L. acidophilus* GH 201 խառը կուլտուրաների հակամանրէային ակտիվությունները ակնհայտորեն ավելի բարձր են, քան առանձին կուլտուրաներինը:

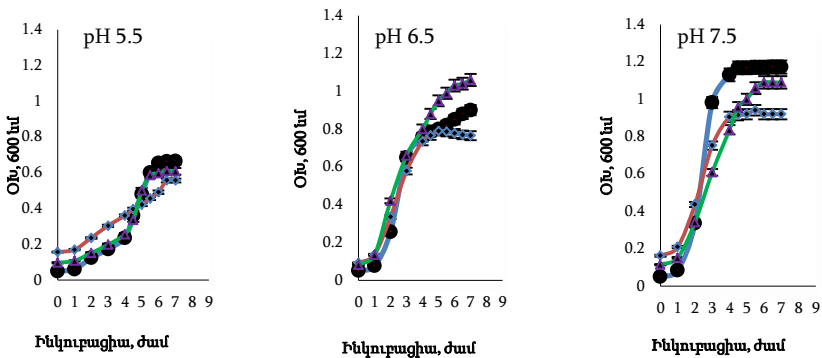


Նկար 5. Թեստ-շտամների՝ ա) *E. coli* MDC 5003, բ) *S. aureus* MDC 5233, գ) *C. albicans* MDC 8013, ճնշման գոտիները կուլտուրաների վերստվածքային հեղուկներով (1 – *L. lactis* GH 204, 2 – *L. acidophilus* GH 201, 3 – խառը կուլտուրա)

Ուսումնասիրվել է համակեցությունների աճի արագությունը տարբեր pH-ներով սննդամիջավայրերում: Ինչպես երևում է Նկ. 6 և 7-ից, pH 6.5 – ում բացիլների և կոկերի միջև սիներգիզմն ակնհայտ է, քանի որ նրանց խառը կուլտուրաներն աճում են ավելի արագ և կուտակում մեծ քանակությամբ կենսազանգված, քան առանձին կուլտուրաները: Ինչպես և սպասվում էր *L. lactis* GH 204 աճի տեմպը pH 7.5- ում գերազանցում է *L. plantarum* GH 202, *L. acidophilus* GH 201 շտամների և խառը կուլտուրաների աճերի տեմպերին: pH 5.5 - ում բոլոր կուլտուրաների աճի տեմպը դանդաղ է և նրանց միջև էական տարբերություն չի նկատվում:



Նկար 6. *L. plantarum* GH 202 և *L. lactis* GH 204 համատեղ աճը տարբեր pH - ներով սննդամիջավայրերում (●— *L. lactis* GH 204, ◆— *L. plantarum* GH 202, ▲— Խառը կուլտուրա)



Նկար 7. *L. acidophilus* GH 201 և *L. lactis* GH 204 համատեղ աճը տարբեր pH - ներով սննդամիջավայրերում (●— *L. lactis* GH 204, ◆— *L. acidophilus* GH 201, ▲— Խառը կուլտուրա)

Համակեցությունների կուլտուրաների միջև սիներգիզմի մասին են վկայում նաև նրանց սիմբիոտիկ ինդեքսները (Աղ. 2):

Աղյուսակ 2.

Համակեցությունների կուլտուրաների սիմբիոտիկ ինդեքսները տարբեր pH-ների պայմաններում

Շտամ	SI		
	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
<i>L. acidophilus</i> GH 201	1.08 ± 0.02	1.41 ± 0.02	1.17 ± 0.02
<i>L. plantarum</i> GH 202	1.3 ± 0.02	1.8 ± 0.02	0.94 ± 0.02
<i>L. lactis</i> GH 204	0.91 ± 0.02	1.13 ± 0.02	1.21 ± 0.02

Ինչպես երևում է Աղ. 2 - ից pH 6,5 – ում համատեղ աճը բարենպաստ է բոլոր կուլտուրաների համար, pH 5,5 – ում՝ լակտոբացիլների համար, իսկ pH 7,5- ում՝ *L. lactis* GH 204 –ի համար: Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ pH 6.5 –ը առավել օպտիմալ է համակեցությունների աճի համար:

Համակեցությունների կայունության ստուգումը պարբերական վերացանքների միջոցով pH 7.3 - 7.6 - ուղ LAPTg արգանակի մեջ, որի pH – ը գիշերային աճի արդյունքում նվազում է մինչև 4.5, ինչը բնորոշ է կնոջ օրգանիզմում տեղի ունեցող ֆիզիոլոգիական ցիկլիկ պրոցեսներին, ցույց տվեց, որ *L. plantarum* GH 202 / *L. lactis* GH 204 և *L. acidophilus* GH 201 / *L. lactis* GH 204 կուլտուրաների հարաբերությունը չորս վերացանքներից հետո դառնում է մոտավորապես 4:1 և անփոփոխ պահպանվում հետագա վերացանքների ընթացքում:

Աղյուսակ 3.

Համակեցության կուլտուրաների հարաբերությունը վերացանքների ընթացքում

Վերացանք	0	1	2-3	4-10
<i>L. plantarum</i> GH 202 / <i>L. lactis</i> GH 204, %	50:50	50:50	60:40	75:25
<i>L. acidophilus</i> GH 201 / <i>L. lactis</i> GH 204, %	50:50	50:50	65:35	70:30

Ուսումնասիրվել է նաև *L. acidophilus* GH 201 և *L. plantarum* GH 202-ի ազդեցության *L. lactis* GH 204 – ի հետ (Նկ. 8): Փորձերի արդյունքում ի հայտ է բերվել *L. lactis* GH 204-ի բավականին բարձր ազդեցության *L. acidophilus* GH 201 և *L. plantarum* GH 202 հետ, համապատասխանաբար՝ 65,83% և 72,38%, ինչը գերազանցում է համակեցությունների մեջ մտնող առանձին կուլտուրաների ինքնաազդեցության (Նկ. 1 ա):

Խառը կուլտուրաների համաազդեցային բարձր աստիճանը մեծացնում է համատեղ գաղութացման հավանականությունը:





Անջատված և նույնականացված լակտոբացիլներից ու լակտոկոկներից հինգն ավանդադրված են ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ-ի Մանրէների ավանդադրման հանրապետական կենտրոնում:

### ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Մշակվել է ԿԹԲ-ների կուտակային կուլտուրաների ստացման եղանակ, որի օգնությամբ հայաստանաբնակ, վերարտադրողական տարիքի 39 կանանցից անջատվել են 40 մաքուր կուլտուրաներ՝ բացիլներ և կոկեր՝ 3:1 հարաբերությամբ:
2. ԿԹԲ-ների նույնականացումն ըստ Բերջիի բակտերիաների դրոշիչի, API 50 և RAPD ՊՇՌ թեստերի տվյալների ցույց տվեց, որ ցուպիկները պատկանում են *L. plantarum* (22.5%), *L. delbrueckii* (15%), *L. acidophilus* (12.5%), *L. helveticus* (5%), *L. fermentum* (2.5%), *L. salivarius* (2.5%), *L. rhamnosus* (2.5%), իսկ կոկերը՝ *L. lactis* (22.5%), *L. cremoris* (12.5%) և *Str. thermophilus* (2.5%) տեսակներին:
3. Անջատված կուլտուրաների մեծ մասն օժտված է արտահայտված հակամանրէային ակտիվությամբ, բարձր աճի արագությամբ, ադիեզիվ, ինքնա և համաագրեզացիոն ունակություններով:
4. Կուլտուրաների հակամանրէային ակտիվությունը պայմանավորող միացություններն ունեն սպիտակուցային բնույթ: Որոշ շտամների մոտ պրոտեինազների հանդեպ կայուն հակամանրէային ակտիվությունը պայմանավորված է ջրածնի պերօքսիդի առկայությամբ:
5. *C. albicans* - ի բջիջների մշակումը *L. plantarum* GH 202-ի վերնստվածքային հեղուկով կտրուկ նվազեցնում է նրանց ադիեզիվ հատկությունները:
6. Հեշտոցից անջատված կոկերը և ցուպիկները, ի համեմատ այլ աղբյուրներից անջատված շտամների, ցուցաբերում են բարձր ագրեզացիոն ունակություն *C. albicans* - ի հետ, որով կարող են խոչընդոտել նրա ադիեզիային էպիթելիալ բջիջների վրա:
7. Լակտոբացիլներից և լակտոկոկներից կազմված բնական և արհեստական սիմբիոտիկ կայուն համակեցություններն իրենց հակաբակտերիալ, հակասնկային ակտիվություններով և աճի արագությամբ գերազանցում են մոնոկուլտուրաներին:

**Ատենախոսության հիմնական արդյունքները տպագրված են հետևյալ  
աշխատանքներում**

1. Hovhannisyan H.G., Barseghyan A.H., **Grigoryan G.G.**, Grigoryan N.G., Pashayan M.M. Newly Isolated Lactobacilli Against Sexually Transmitted Diseases // “Human Microbiome Research Conference”, August 31-September 2, 2010, St. Louis, Missouri, USA. Presentations, p. 74
2. **Grigoryan G.G.**, Hovhannisyan H.G. Probiotic Properties of *Lactococcus lactis ssp.* GH 12, Isolated from Female Vagina // Scientific Seminar “Modern State of Biotechnological Developments and Ways of Commercialization”, September 11-12, 2012, Yerevan, Armenia. Book of Abstracts, p. 33
3. **Grigoryan G.G.**, Hovhannisyan H.G. Creation of Lactobacilli and Lactococci Association for Treatment and Prophylaxis of Bacterial Vaginosis // 2-nd International Scientific Conference of Young Researchers “Contribution of the Young Generation in the Development of Biotechnology”, October 1-4, 2013, Yerevan, Armenia. Book of Abstracts, p. 53
4. **Գրիգորյան Գ.Գ.**, Հովհաննիսյան Հ.Գ. Հեշտոցային լակտոկոկերի անջատումը և բնութագրումը // Հայաստանի բժշկագիտություն, 2013, LIII, №3, էջ 94-101
5. **Գրիգորյան Գ.Գ.** Հեշտոցից անջատված լակտոբակտերիաների համակեցության ուսումնասիրությունը // Հայաստանի բժշկագիտություն, 2014, LIV, №2, էջ 102-108
6. Hovhannisyan H.G., **Grigoryan G.G.** A new sustainable symbiotic association of lactic acid cocci and bacilli for colonization/recolonization of vagina and prevention of bacterial vaginosis // American Journal of BioScience. Vol. 2, No. 3, 2014, p. 84-88. doi: 10.11648/j.ajbio.20140203.11
7. **Grigoryan G.G.**, Hovhannisyan H.G. Sustainable symbiotic association of lactic acid cocci and bacilli for colonization/recolonization of vagina and prevention of bacterial vaginosis // International Scientific Workshop “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”, October 5-8, 2014, Yerevan, Armenia. Book of Abstracts, p. 55
8. ՀՀ Արտոնագիր № 2887 A, *Lactococcus lactis* GH 204 և *Lactobacillus plantarum* GH 202 շտամեր և դրանց սիմբիոտիկ կոնսորցիումը՝ հեշտոցային դիսբակտերիոզների և սեռավարակների կանխարգելման և բուժման համար / Հովհաննիսյան Հ., **Գրիգորյան Գ.** 25.11.2014, 14 էջ
9. ՀՀ Արտոնագիր № 2888 A, *Lactococcus lactis* GH 204 և *Lactobacillus acidophilus* GH 201 շտամեր և դրանց սիմբիոտիկ կոնսորցիումը՝ հեշտոցային դիսբակտերիոզների և սեռավարակների կանխարգելման և բուժման համար / Հովհաննիսյան Հ., **Գրիգորյան Գ.** 25.11.2014, 13 էջ

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ  
ЛАКТОБАКТЕРИЙ ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИСТОЧНИКА

РЕЗЮМЕ

**Ключевые слова:** Вагинальные пробиотики, молочнокислые бактерии, микробные взаимодействия, бактериальная адгезия, аутоагрегация, коагрегация.

Видовое разнообразие вагинальных МКБ у женщин, живущих в различных географических регионах, сильно отличается в зависимости от климатических условий, диеты, образа жизни и т.д. По литературным данным, у женщин Европы и Америки вагинальная микрофлора в основном представлена бациллами, в Европе и Северной Америке доминирует *L. crispatus*, а в Азии *Pediococcus*. 40 чистых культур МКБ, выделенных у 39 женщин репродуктивного возраста, живущих в Армении, были представлены как бациллами, так и кокками в соотношении 3 : 1. Идентификация изолированных штаммов показала, что бациллы принадлежат к *L. plantarum* (22.5%), *L. delbrueckii* (15%), *L. acidophilus* (12.5%), *L. helveticus* (5%), *L. fermentum* (2.5%), *L. salivarius* (2.5%), *L. rhamnosus* (2.5%), а кокки - к *L. lactis* (22.5%), *L. cremoris* (12.5%) и *Str. thermophilus* (2.5%) видам.

Антимикробная активность МКБ в основном обусловлена синтезом молочной кислоты, перекиси водорода и бактериоцинов. Все культуры, изолированные нами, за день продуцируют 8.1-15.3 мг/мл молочной кислоты. Противомикробная активность культуральных жидкостей, нейтрализованных с помощью NaOH, а также потеря их активности после обработки протеазами (протеиназа К, пепсин и трипсин) свидетельствуют о синтезе лактацинов у МКБ. Сохранение антимикробной активности у некоторых штаммов: *L. acidophilus* GH 201, *L. plantarum* GH 202 и *L. delbruecki* GH 205, обусловлено образованием ими перекиси водорода.

Изучение адгезивных свойств изолированных штаммов в условиях *in vitro* показало высокую коагрегационную способность *L. acidophilus* GH 201, *L. plantarum* GH 202 и *L. delbruecki* GH 205 штаммов (соответственно 50.73%, 49.71% и 35.8%) с *C. albicans* - основным возбудителем вагинозов. Пробиотические бактерии путем коагрегации с патогенными микроорганизмами препятствуют их адгезии к эпителиальным клеткам, а также повышают эффективность антимикробного действия. Так, присутствующие в супернатанте *L. plantarum* GH 202 метаболиты, резко снижают адгезивные свойства *C. albicans*: с 46.6% до 12.64%. Особый интерес представляет тот факт, что изолированный нами *L. lactis* GH 204 также обладает высокой

коагрегационной способностью с *C. albicans*, превосходящей известный штамм *L. lactis* ATCC 19435 примерно в 20 раз.

Бактериальная адгезия является важным фактором в формировании биопленок, главным образом за счет гидрофобности и заряда клеточной поверхности. Изучение адгезии с помощью MATS теста показало, что изолированные нами *L. lactis* GH 204 и *L. lactis* GH 211 обладают до сих пор неопиленной для кокков гидрофобностью, соответственно 65.32% и 25.52%. Остальные лактококки не отличаются от известных *L. lactis* ATCC 19435 и *L. lactis* HV219, которые проявляют всего 0.78 – 4.0% гидрофобность. Из лактобацилл *L. acidophilus* GH 201 и *L. plantarum* GH 202 имели соответственно 47.47% и 46.94% гидрофобность, что свидетельствует об их высокой адгезивной способности.

Доступные на рынке вагинальные пробиотические препараты в основном состоят из нескольких видов лактобацилл, однако из-за отсутствия симбиоза между ними влагалище в конечном счете колонизируется одним видом. В результате исследований впервые из влагалища удалось изолировать устойчивую симбиотическую ассоциацию, состоящую из бациллы и кокка, которая имела более высокую антимикробную активность и скорость роста, чем монокультуры. Приняв в качестве прототипа указанную ассоциацию, нами были созданы консорциумы из биосовместимых кокков и бацилл, обладающие высокой устойчивостью в условиях циклических физиологических изменений. Высокая степень коагрегации входящих в состав консорциумов *L. lactis* GH 204 с *L. acidophilus* GH 201 и *L. plantarum* GH 202 (соответственно 65.83% и 72.38%) является гарантом их стабильности. Созданные симбиотические консорциумы, по сравнению с входящими в их состав монокультурами, обладали более высокой антимикробной активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям, а также к *C. albicans* и скоростью накопления биомассы.

Эффективность восстановления периодических нарушений баланса микрофлоры и pH влагалища симбиотическими консорциумами по сравнению с монокультурами, связана со способностью роста лактобацилл и лактококков в различных диапазонах pH. Анализ симбиотических индексов показал, что в диапазоне pH 5.5 – 7.5 совместный рост благоприятен для всех культур, входящих в состав консорциумов.

Таким образом, впервые было показано, что лактококки отдельно и в составе консорциумов с лактобациллами могут быть использованы для вагинальной колонизации/реколонизации, что значительно повышает устойчивость вагинальной микрофлоры к циклическим изменениям ее состава и pH. Впервые было показано существование синергизма между лактококками и лактобациллами, что находило отражение в их более высокой антимикробной активности по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям и к *C. albicans*, а также высокой способности к колонизации вагинальной

экосистемы. Высокая гидрофобность штаммов, входящих в состав консорциумов, обнаруживаемая с помощью MATS теста, может способствовать образованию биопленки и колонизации вагинального биотопа смешанными культурами.

GRIGORYAN GOHAR GAGIK

## ISOLATION, STUDY AND GENETIC IDENTIFICATION OF NEW LACTOBACTERIA OF HUMAN ORIGIN

### SUMMARY

**Key words:** vaginal probiotics, lactic acid bacteria, microbial interactions, bacterial adhesion, autoaggregation, coaggregation.

The species diversity of vaginal LAB of women living in different geographical regions significantly differs depending on the climatic conditions, diet, lifestyle, etc. According to the literature, in Europe and North America women's vaginal microflora is mainly represented by bacilli, where *L. crispatus* dominates, but in Asia - *Pediococcus*. 40 pure LAB cultures isolated from 39 women of reproductive age living in Armenia were represented by both bacilli and cocci in the ratio 3 : 1. The identification of the isolated strains showed that the bacilli belonged to *L. plantarum* (22.5%), *L. delbrueckii* (15%), *L. acidophilus* (12.5%), *L. helveticus* (5%), *L. fermentum* (2.5%), *L. salivarius* (2.5%), *L. rhamnosus* (2.5%), and cocci – to *L. lactis* (22.5%), *L. cremoris* (12.5%) and *Str. thermophilus* (2.5%) species.

The antimicrobial activity of LAB is mainly caused by the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocins. All isolated cultures produce 8.1-15.3 mg/ml lactic acid per day. The antimicrobial activity of culture fluids neutralized with NaOH, as well as the loss of their activity after treatment with proteases (proteinase K, trypsin, and pepsin) indicate the synthesis of lactacins in LAB. The preservation of the antimicrobial activity in some strains: *L. acidophilus* GH 201, *L. plantarum* GH 202 and *L. delbrueckii* GH 205 is due to the formation of hydrogen peroxide.

The study of adhesive properties of isolated strains *in vitro* conditions showed high coaggregation ability of *L. acidophilus* GH 201, *L. plantarum* GH 202 and *L. delbrueckii* GH 205 (50.73%, 49.71% and 35.8% respectively) with *C. albicans* - the main causative agent of vaginosis. Probiotic bacteria inhibit pathogens adhesion to epithelial cells due to coaggregation with them, and also improve the efficiency of antimicrobial action. Thus, metabolites present in the supernatant of *L. plantarum* GH 202 drastically reduce the adhesive properties of *C. albicans* from 46.6% to 12.64%. The fact of special interest is that *L. lactis* GH 204 isolated by us has also a high coaggregation capacity with *C. albicans*, about 20 times surpassing the well-known strain *L. lactis* ATCC 19435.

Bacterial adhesion is an important factor in the formation of biofilms, mainly due to the hydrophobicity and charge of the cell surface. The study of adhesion by MATS test showed that *L. lactis* GH 204 and *L. lactis* GH 211 isolated by us had so far undescribed for cocci hydrophobicity, 65.32% and 25.52% respectively. The remaining lactococci do not differ from the well-known *L. lactis* ATCC 19435 and *L. lactis* HV219, which show only 0.78 - 4.0% of hydrophobicity. *L. acidophilus* GH 201 and *L. plantarum* GH 202 of lactobacilli have hydrophobicity 47.47% and 46.94%, respectively, which indicates their high adhesiveness.

Vaginal probiotic preparations available in the market contain mainly several species of lactobacilli, but due to the lack of symbiosis between them, the vagina is finally colonized by one species. For the first time we managed to isolate from the vagina a stable symbiotic association consisting of bacilli and cocci, which had a higher antimicrobial activity and growth rate than monocultures. Taking the mentioned association as the prototype, we have created consortia of biocompatible cocci and bacilli, possessing high stability under cyclic physiological changes. High degree of *L. lactis* GH 204 coaggregation with *L. acidophilus* GH 201 and *L. plantarum* GH 202 in the consortia composition (65.83% and 72.38%, respectively) is a basis of their stability. The created symbiotic consortia in comparison with their member monocultures possess higher antimicrobial activity in relation to pathogenic and opportunistic bacteria, as well as to *C. albicans* along with higher rate of biomass accumulation.

The recovery efficiency of periodic disturbances of vaginal pH and microbial balance by the symbiotic consortia compared with monocultures is connected with the growth ability of lactobacilli and lactococci in various pH ranges. The analysis of symbiotic indices shows that in the pH range 5.5 - 7.5 joint growth of cultures included in the consortia is favorable for all cultures.

Thus, for the first time it has been shown that the lactococci can be used for vaginal colonization/recolonization by themselves and in consortia with lactobacilli, which significantly increases the stability of the vaginal microflora to cyclic changes of its composition and pH. For the first time the existence of synergies between lactococci and lactobacilli has been shown, which is reflected in their higher antimicrobial activity against pathogenic and conditionally pathogenic bacteria and *C. albicans*, as well as by high capability to colonize the vaginal ecosystem. The high hydrophobicity of the strains in the consortia detected by MATS test, can promote the biofilm formation and colonization of vaginal biotope with mixed cultures.